

血清鉄濃度を炎症マーカーの代替として用いた  
牛の炎症評価に関する研究

嶋 守 俊 雄

血清鉄濃度を炎症マーカーの代替として用いた  
牛の炎症評価に関する研究

酪農学園大学大学院  
獣医学研究科  
獣医学専攻博士課程

嶋守 俊雄  
生産動物外科学

指導教員 教授 鈴木 一由  
2019 年度

# 目 次

緒言	．．． 1
第1章 粒子励起 X 線分析 (PIXE: Particle Induced X-ray Emission)法	
による牛の炎症と血清微量元素動態の網羅的調査	．．． 9
1.1 牛血清中微量元素濃度の多元素同時定性定量における PIXE 法の	
精度および正確度の検証	．．． 10
1.1.1 材料および方法	
1.1.2 統計解析	
1.1.3 結果	
1.1.4 考察	
1.2 甚急性乳房炎牛における PIXE 法を用いた血清中微量元素濃度の	
スクリーニング調査	．．． 14
1.2.1 材料および方法	
1.2.2 統計解析	
1.2.3 結果	
1.2.4 考察	
1.3 小括	．．． 19
第2章 エンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いた	
血清微量元素動態と炎症との関係	．．． 27
2.1 多元素同時定性定量法である PIXE 法を用いた実験的エンドトキシン	
ショック牛の血清中 Fe および Zn 濃度の経時的変化	．．． 29
2.1.1 材料および方法	
2.1.2 統計解析	

2.1.3	結果	
2.1.4	考察	
2.2	実験的エンドトキシンショック牛における血清中 Fe 濃度と 肝臓中へプシジン遺伝子発現量の経時的变化	・・・ 33
2.2.1	材料および方法	
2.2.2	統計解析	
2.2.3	結果	
2.2.4	考察	
2.3	小括	・・・ 39
第3章	生化学検査機器による Nitroso-PSAP 法で測定した血清中 Fe 濃度を 指標とした牛の炎症性疾患の評価	・・・ 48
3.1	牛のマイナーサージェリーにおける炎症マーカーとしての 血清中 Fe 濃度の有用性	・・・ 49
3.1.1	材料および方法	
3.1.2	統計解析	
3.1.3	結果	
3.1.4	考察	
3.2	甚急性乳房炎の予後と血清中 Fe 濃度の関係	・・・ 53
3.2.1	材料および方法	
3.2.2	統計解析	
3.2.3	結果	
3.2.4	考察	
3.3	小括	・・・ 57

総括	・ ・ ・ 63
謝辞	・ ・ ・ 69
利益相反	・ ・ ・ 71
引用文献	・ ・ ・ 72
略語一覧	・ ・ ・ 86
成績の公表	・ ・ ・ 89
英文要旨	・ ・ ・ 90

## 緒 言

牛の乳房炎は乳腺内感染に継続する乳腺の炎症性疾患である。本疾患は酪農業において発生率が高く経済的損失の最も大きい疾病と認識されており、国内の乳房炎による経済損失を調査した報告はないが、米国での調査によると乳房炎の経済損失は実に年間でおおよそ 2,000 億円にのぼるとされる[44、45、70、75]。*Escherichia coli* (*E. coli*) や *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) などのグラム陰性大腸菌群による甚急性大腸菌性乳房炎 (ACM : Acute Coliform Mastitis) は、血液—乳関門の破綻による菌血症や敗血症を引き起こし、重篤な全身および局所の炎症に加え乳生産能に大きな影響を与える[35、37、65]。*E. coli* や *K. pneumoniae* によるこれらの症状はエンドトキシンに由来する[20]。エンドトキシンはグラム陰性菌が死滅する際に放出される一次毒性物質である[37]。反芻動物ではエンドトキシンに対する病態生理学的影響は用量依存的であり、さまざまな代謝的および臨床的徴候を誘発する[48、51]。エンドトキシンは、マクロファージを刺激して腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )、インターロイキン (IL : Interleukin) -1 および 6 などのサイトカインを放出させることが知られている[25、92]。これらの内因性炎症メディエーターの循環系への放出は、重篤化した ACM が呈する諸症状の主な原因であると考えられている[25、49、92]。ACM では全身症状として食欲不振、発熱、脱水および乳生産量の減少が観察される [21、27、88]。すなわち、ACM はエンドトキシン由来の炎症反応の重篤度により予後が大きく異なり、しばしば致命的である[22、92]。さらに、Hogan ら[37]は、グラム陰性菌による重篤な乳腺内炎症 (IMI : Intra-Mammary inflammation) を呈した牛のおおよそ 25% は死亡または淘汰の転帰となることを報告している。ACM に対する治療が奏功する

かどうかは、早期診断および予後評価などの適切な判断に左右される。ACM の臨床症状に基づいて重症度を評価する方法[88]が提案されているが、臨床現場において十分に普及しているとは言い難い。したがって、ACM の重症度を反映する鋭敏なバイオマーカーが利用できれば、予後評価に有用なマーカーとなり得る。

体細胞数（SCC : Somatic Cell Count）[42、85]および急性相タンパク（APPs : Acute Phase Proteins）[36、77]などのマーカーが、実験的 ACM モデルにおいて調査されている。SCC は牛乳房炎において著明なマーカーであると考えられていたが[6、8、78]、近年の研究では SCC が ACM の重症度を直接評価するための基準として不適切であることが報告されている[54]。炎症は細胞や組織の損傷に対する複合的な反応であり、非特異的な全身での急性炎症による反応は急性相反応と呼ばれる。炎症に対する宿主の反応、つまり急性相反応は、血漿タンパク濃度の著しい変化を伴う一連の生理学的反応である[9]。炎症性サイトカインに対する全身反応には、肝臓からの APPs の産生と分泌が含まれる[18]。APPs は炎症反応の初期に放出されるため、APPs を測定することにより炎症の早期発見が可能である。例えば、人で汎用されている C 反応性タンパク（CRP : C reactive Protein）は、牛での応用がなされていない[10、31、62]。その理由として CRP は反芻動物の炎症に対して正常値の 2~10 倍程度しか増加しないために明確な診断が得られていないためである[53]。牛において測定可能な主な APPs はハプトグロビン（Hp : Haptoglobin）、血清アミロイド A（SAA : Serum Amyloid A）、リポポリサッカライド（LPS : Lipopolysaccharide）結合タンパク、 $\alpha$ 1 酸性糖タンパク、トランスフェリンであり[23、38、52、86]、これらは ACM に有用なマーカーとなり得



る。加えて、炎症性サイトカインである IL-6 が ACM[32]および潜在性乳房炎[69]の早期診断に有用であることが報告されている。しかし、これらの炎症マーカーおよび炎症性サイトカインの測定は牛に特異的な抗体を有していない一般的な検査会社では難しいために経費、労力、時間的な制限がある。

人や動物における多くの慢性疾患は、数種の元素の蓄積を誘導する細胞外基質の代謝の変化に関連している。したがって、炎症と微量元素との関係を知ることは有用である。例えば、Se はシグナル伝達に関わる様々な調節タンパクの機能を調節しており、この調節は炎症性疾患を有する動物において有利に働く。Zang ら[91]によれば、Se 欠乏マウスの乳腺上皮細胞において LPS により誘導されるシクロオキシゲナーゼ 2 と TNF- $\alpha$  の発現が有意に低下した。加えて、エンドトキシンにより産生されるフリーラジカルは、Ca<sup>2+</sup>の動員によって制御され、これらによって生じた酸化ストレスは内因性の亜鉛 (Zn) またはセレン (Se) 調節に影響を及ぼすことが報告されている[68]。また、鉄 (Fe) は様々な酵素反応に関与し、宿主、病原体双方の必須元素であることが知られている[13、60]。さらに、ハムスターを用いた研究では、エンドトキシンチャレンジにより惹起される甚急性相で IL-1 の放出が誘導された結果、血清中銅 (Cu) 濃度が上昇することが明らかになっている。血清中 Cu 濃度は、他動物種においても甚急性相反応で上昇することが知られており、これには血清中の Cu 結合タンパクであるセルロプラスミン濃度の上昇が関与している[28、89]。

これらの報告は炎症により血液レベルで微量元素の有意な変動が生じていること、さらにはこれらの炎症に関連した微量元素をモニタリングすることによって炎症の

程度や予後評価に用いられる可能性を示唆している。微量元素の測定は多元素同時定性定量法によりスクリーニング調査することが可能である。したがって、エンドトキシン由来の炎症と主要および微量元素の関係を調査することはエンドトキセミアの診断に有用であると考えられる。しかし、エンドトキセミアを呈した牛の血清中主要および微量元素を網羅的に調査した研究は未だなく、炎症の指標として用いるべき微量元素の抽出が必要である。また、炎症の程度を敏感に反映する元素を抽出することが可能であったとしてもその元素の測定方法が煩雑で高額であれば牛医療での臨床応用は難しいために、一般的な検査機関で安価に検査可能な微量元素を指標とすることができればそれが望ましい。例えば、牛の血清中 Fe 濃度も炎症反応を反映している可能性がある。血清中 Fe 濃度の測定は、一般的な検査会社で 1 件体当たり 200～300 円程度での測定が可能であることから、血清中 Fe 濃度が炎症に関連しているのであれば牛の炎症性マーカーとして条件を満たす可能性がある。血清中 Fe 濃度の測定は安価で簡便なため、炎症と血清中 Fe 濃度との関係を評価することは周術期や疾病における炎症反応を評価する上で有用であると考えられる。

急性炎症を生じている患者[84、87]や動物[39、40]の血液中 Fe 濃度は著しく減少することが報告されている。例えば、Neumann [57]は、炎症性疾患を患っている猫の 90% および犬の 60% で血清中 Fe 濃度が低下したことを報告した。この炎症による血清中 Fe 濃度の減少は、腸管での Fe 吸収の減少および細網内皮細胞による Fe の放出減少に起因している[4、15、16]。生体内において、全身の Fe 恒常性はヘプシジンにより調節されている[3]。ヘプシジンは炎症に反応して主に肝細胞から分泌され[19、46、

61、64、66]、その主な機能は Fe を隔離することである[90]。IL-6 は、炎症によるヘプシジン誘導における重要なメディエーターとして同定された[58]。さらに、人において IL-6 の投与によりヘプシジンの分泌が誘導され血清中 Fe が減少することが確認されている[59]。しかし、炎症性疾患を伴う牛でも同様の変化が起こるかどうかは明らかになっていない。Jacobsen ら[41]は、骨軟骨病変、喉頭神経障害および卵巣腫瘍に罹患した馬では、術後 24 時間以内に血清中 Fe 濃度が低下したことを報告している。よって本研究は、牛の炎症性疾患、特に ACM において、一般的な炎症マーカーである APPs の測定が牛に特異的な抗体を用いるために特殊な検査機関に検査を依頼するか診療施設での測定系を確立しなければならず実用に至っていないために、これらの炎症マーカーの代替となる簡便かつ安価な指標を確立するとともに、その応用を検証した。特に、Cu、Fe、Se および Zn などの微量元素は炎症反応に密接に関連していることから本研究では APPs の代替候補として微量元素に着目した。すなわち本研究では、(1) 多元素同時定性定量法を用いた牛の炎症性疾患と血清微量元素動態の網羅的調査、(2) エンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いて炎症により血清中 Fe 濃度が減少する機序を解明し、そして (3) 簡易法で測定した血清中 Fe 濃度を用いて牛の炎症の評価が可能か否かについて非感染性炎症として除角手術を受けた牛を、感染性炎症として ACM 罹患牛を用いてそれぞれ評価を行った。

詳述すると、第 1 章では多元素同時定性定量法のひとつである粒子励起 X 線分析法 (PIXE : Particle Induced X-ray Emission) を用いて ACM 牛の血清中微量元素濃度のスクリーニング調査を実施した。PIXE 法は、簡便かつ迅速で信頼性の高い多元素同

時定性および定量分析法である[17]。この方法では、標的原子の内殻がイオン化されたときに放出される特性X線を検出器が分析する[17]。測定は、数  $\mu\text{g}$  のサンプルで ppm レベルの分析が可能である。PIXE 法では煩雑な調製過程が必要ないため、外部からの分子混入による汚染リスクが著しく低い[79、80]。以前の研究では、PIXE 法を用いて病態生理学および病理学的条件下で、肝臓[29、33]、骨[24]、血漿[14、81、82]、血清[29、47]などの生体試料中の微量元素濃度が評価されており、多くの種の生体試料での研究が行われている。しかし、牛の血漿および血清試料に対する PIXE 法の精度および正確度について評価した報告は著者らが知る限りないため、第 1 節では PIXE 法によって牛の血清中微量元素濃度が正確に測定できるか否かを評価する目的で牛のプール血清に既知の微量元素を添加してその回収率を求めることにより精度および正確度を評価した。そして第 2 節では牛の血清試料に対する精度および正確度が担保された PIXE 法を用いて、牛の典型的な炎症性疾患である ACM に罹患した乳牛の血清中主要および微量元素を測定し、エンドトキシン由来の炎症と微量元素濃度の関係をスクリーニングするとともに、生産動物医療において簡便かつ安価に測定することが可能な微量元素を条件に、炎症評価が可能な微量元素の選定を試みた。第 2 章では、炎症評価が可能である微量元素として第 1 章で抽出された血清 Fe 濃度について、実験的に炎症を惹起して血清中 Fe 濃度と炎症の関係、また血清 Fe 動態を調節すると思われるヘプシジンの肝臓での遺伝子発現について評価した。すなわち、第 1 節ではエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いた血清微量元素動態と炎症の関係について PIXE 法によりスクリーニング調査を行い、第 2 節では同モデルを用いて

炎症と血清中 Fe 濃度および肝臓におけるヘプシジン遺伝子の発現について評価した。

第 3 章では、一般的な生化学検査法である 2-ニトロソ-5- (*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ) フェノール (Nitroso-PSAP) 法を用いて測定した血清中 Fe 濃度が牛の炎症性疾患の病態評価に有効であるかを検証した。すなわち、第 1 節では牛の日常的なマイナーサージェリーのひとつである除角に着目し、除角による炎症を急性相タンパクのひとつである SAA と共に Nitroso-PSAP 法によって測定した血清中 Fe 濃度を用いて評価した。また、第 2 節では、第 1 章において PIXE 法によるスクリーニングで血清中 Fe 濃度が ACM の炎症マーカーとして抽出されたことを受け、Nitroso-PSAP 法によって測定した血清中 Fe 濃度でも ACM 罹患牛の炎症状態や予後評価が可能であるか否かを確認した。本研究は、牛の炎症性疾患において本来であれば APPs などの急性相タンパクを用いた炎症評価を行うべきところを牛の臨床における経済的、時間的、労力的制限を考慮して炎症に関連した血清微量元素、特に血清中 Fe 濃度を代替のマーカーとして臨床応用することが可能か否かを評価するとともに、牛の炎症によって血清中 Fe 濃度が減少する機序の一部を明らかにすることを目的として臨床症例およびエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いて研究を遂行した。すなわち、本研究は生産性を重視した牛の臨床という制限のなかで如何に簡便かつ安価に正しい炎症状態を評価することができるかをその機序の解明を含めて検証した。

## 第 1 章

### PIXE 法による

### 牛の炎症と血清微量元素動態の網羅的調査

本章でははじめに、PIXE 法によって牛の血清中微量元素濃度が正確に測定できるか否かを評価する目的で牛のプール血清に既知の微量元素を添加し、その回収率を求め精度管理を実施した。その後、PIXE 法において牛の血清中微量元素濃度を正確にスクリーニングできることが保証されたのであれば、第 1 章第 2 節では本章の主たる目的である ACM 罹患牛を対象に PIXE 法を用いて ACM と関連する血清中主要および微量元素とはどのようなものか選定を試みた。

### 1.1 牛血清中微量元素濃度の多元素同時定性定量における PIXE 法の精度および正確度の検証

本研究では、血清中微量元素濃度の多元素同時定性定量を仁科記念サイクロトロンセンター（岩手県滝沢村）に設置されている PIXE を用いて測定を行った。仁科記念サイクロトロンセンターの PIXE システムは、初期設定[71、72]と同等の条件下で維持されている。すなわち定期的に誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS : Inductive-Coupled Plasma Mass Spectrometers）および中性子放射化分析（NAA : Neutron Activation Analysis）により得られた結果を本 PIXE システムの測定結果と比較することで定期的に分析精度を確認している[71、72]。また、仁科記念サイクロトロンセンターでは PIXE 法の精度および正確性を、施設のガイドラインに従って定期的に標準試料（牛肝臓、トマト葉、都市灰およびヒト血清（National Institute of Standards and Technology、U.S. Department of Commerce、Gaithersburg、MD、U.S.A.））を使用して校正および検証を実

施している。しかし、PIXE 法は牛の生体試料の測定において十分な精度および正確度の評価が実施されているわけではない。したがって、一連の研究を実施する前に、PIXE 法によって牛の血清中微量元素濃度が正確に測定できるか否かを評価する目的で牛のプール血清に既知の微量元素を添加しその回収率を求めた。

#### 1.1.1 材料および方法

本研究では、ICP (Inductive-Coupled Plasma) グレードの多元素標準液 (ICP multi-element standard VIII, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて精度管理を行った。蒸留水 (注射用蒸留水 20 ml、大塚製薬社、東京)、牛プール血清、またそれらにそれぞれ多元素標準液を加えて 15 の元素について 10  $\mu\text{g/ml}$  ずつ終濃度が上昇するように調製したものを用意した。多元素標準液の追加前後の血清を PIXE 法により微量元素を測定し、これを計 3 回繰り返した。

PIXE 法の測定原理および測定手順を図 1.1.1 および図 1.1.2 にそれぞれ示した。各平均血清中主要及び微量元素濃度は仁科記念サイクロトロンセンター (岩手県滝沢村) に設備されている PIXE を用いて測定した。100  $\mu\text{l}$  の血清サンプルをマイラー薄膜に滴下し乾燥させたのち (乾燥固化重層)、直接プロトンビームを照射して測定を行った。陽電子核医学に使用されているベビーサイクロトロンを用い、グラファイトビームコリメータを通過した 2.9 MeV のプロトンビームをサンプルに照射し微量元素のスクリーニングを行った。300 および 1000  $\mu\text{m}$  のマイラー吸収板を備えた Si (Li) 半導体検出器 (0.0254 mm Be window) を使用し、K-K $\alpha$  よりも高エネルギーの X 線を



選別した。吸収剤を備えない Si (Li) 半導体検出器 (0.008 mm Be window) で低エネルギー X 線の測定を行った。

### 1.1.2 統計解析

市販の表計算ソフトウェア (マイクロソフトエクセル、Microsoft Co.、Redmond、WA、U.S.A.) を用い、平均値 $\pm$ 標準偏差、変動係数 (CV : Coefficient of Variation)、回収率を算出した。蒸留水におけるスパイク結果と CV に基づいて得られた回収率は 15 の元素 (Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、Mg、Mn、Ni、Pb、Se、Sr、Zn) について算出した。

### 1.1.3 結果

表1.1.1にPIXE法における正確性と精度を要約した。スパイク結果に基づいて得られた回収率とCV値は、Mgを除いた14元素において満足のいく結果が得られた。血清中Mgの回収率およびCV値はそれぞれ114.2 %および0.693であった。その他の元素は極めて信頼性が高いことが示唆された。

### 1.1.4 考察

第 1 章第 1 節では、迅速かつ信頼性の高い多元素定性定量法である PIXE 法により牛の血清中微量元素濃度を正確に測定することができるか否かについて検証を行った。PIXE 法は、ターゲット原子の内殻がイオン化されて放出される特性 X 線を特定

の検出器によって分析する。これは数  $\mu\text{g}$  のサンプルから ppm レベルの濃度で測定可能で、固形試料中の、特に低原子量元素からなる複合体中の中～高原子量元素の分析に適している [17]。その結果、PIXE 法は Mg を除いた 14 元素 (Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、Mn、Ni、Pb、Se、Sr、Zn) において極めて正確かつ高い精度で牛の血清中微量元素濃度測定が行えることが明らかとなった。したがって、本試験における以降の試験では、Mg を除いた 14 元素を中心に検討を行うこととした。

## 1.2 甚急性乳房炎牛における PIXE 法を用いた血清中微量元素濃度のスクリーニング調査

第 1 章第 2 節では、前節で精度および正確度を確認した PIXE 法を用い ACM 罹患牛の血清中主要および微量元素を測定しエンドトキシン由来の炎症と微量元素濃度の関係をスクリーニング調査することを目的とした。また、ACM の診断能を有する微量元素を選定するために、Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を用いて各元素濃度の予後評価へのカットオフ値を求めた。

### 1.2.1 材料および方法

本研究は酪農学園大学動物実験委員会の承認 (Approval # : VC16C1) に基づいて ACM 罹患牛を用いた前向き臨床研究を行った。供試牛として、IMI を伴う ACM に罹患し全身症状を呈した 53 頭のホルスタイン種乳牛を用いた。これらの牛は 1 つ以上の分房で異常乳、腫脹、発赤、浮腫を呈していた。各感染分房より得た生乳から *E. coli* または *K. pneumoniae* を分離培養することで ACM の確定診断とした。罹患牛は以下の乳生産に基づいて予後を良好または不良に区分した。すなわち、初診時より 1 週間以内に死亡または 30 日以内に牛乳生産に復帰しなかった牛を予後不良、30 日以内に生産復帰した牛を予後良好とした。また、本学フィールドセンターで飼育管理されている 39 頭の健常牛を対照として用いた。これらの健常牛はいかなる臨床症状も呈しておらず、乳汁検査において乳汁の異常は認めなかった。すべての供試牛の血清中主

要及び微量元素濃度を測定するため頸静脈より 10 ml 採血して真空採血管に保存した。保存した血液はその日のうちに 3,000 ×g で 10 分間、室温で遠心分離し、得られた血清を測定まで -80 °C で保存した。

血清中主要及び微量元素濃度は仁科記念サイクロترونセンター（岩手県滝沢村）において PIXE 法により測定した。100 µl の血清サンプルをマイラー薄膜に重層固化させたのち、直接プロトンビームを照射して測定を行った。陽電子核医学に使用されているベビーサイクロترونを用い、グラファイトビームコリメータを通過した 2.9 MeV のプロトンビームをサンプルに照射した。300 および 1000 µm のマイラー吸収板を備えた Si (Li) 半導体検出器 (0.0254 mm Be window) を使用し、K-Kα よりも高エネルギーの X 線を選別した。吸収板を備えない Si (Li) 半導体検出器 (0.008 mm Be window) で低エネルギー X 線の測定を行った。

### 1.2.2 統計解析

全ての統計解析は、市販のソフトウェア・パッケージ (IBM SPSS Statistics v.21 ; IBM Co、Armonk、NY、U.S.A.) を用いて行った。正規分布データは平均値±標準偏差で、非正規分布データは中央値（範囲）で示した。健常牛に対する ACM の各種微量元素の平均値の差の検定は、群間の比較には F 検定で分散を評価した後に、等分散であれば、Student's *t* 検定、非等分散であれば 2 群比較で Mann-Whitney *U* 検定または多群比較で Kruskal-Wallis により評価した。また、予後不良群の診断能を ROC 解析により評価し、さらに感度と特異度を以下の通り決定した。すなわち、理

想的カットオフ値はJインデックスに基づいて算出した [2、55]。JインデックスとはROC曲線と対角線の距離と定義され、 $J = \text{maximum (sensitivity + specificity - 1)}$ により計算される。Jインデックスに対応するROC曲線のカットオフ点を理想的カットオフ値とした[2、55]。すべての統計学的解析は有意水準5%未満を有意とした ( $p < 0.05$ )。

### 1.2.3 結果

53頭のACM罹患ホルスタイン種乳牛において、予後良好および予後不良はそれぞれ35および18頭であった。PIXE法によって測定した血清中主要及び微量元素濃度を表1.2.1に要約した。PIXE法によって検出可能であった牛血清中微量元素は28種類 (Na、Mg、Al、Si、S、Cl、K、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、As、Se、Br、Rb、Sr、Y、Zr、Nb、Mo、Pb) であった。Mgについては前節で明らかな通りPIXE法において、精度管理で満足のいく結果が得られなかったため統計解析から除外した。さらに残りの27元素のうち、前節で精度管理が確認された14元素 (Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、Mn、Ni、Pb、Se、Sr、Zn) について更なる検討を加えた。その結果FeおよびZnにおいて両群間で有意な差が認められた。

図1.2.1に健常牛およびACM牛の血清中Zn濃度の比較を示した。ACM罹患牛の血清中Zn濃度は  $0.897 \pm 0.561 \mu\text{g/ml}$  であり、健常牛の  $1.322 \pm 0.580 \mu\text{g/ml}$  と比較し有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。しかしながら、血清中Zn濃度はACM罹患牛の予後の

違いによる差は認められなかった ( $p>0.05$ )。

一方で、血清中 Fe 濃度は ACM 罹患牛で  $0.879\pm0.470\text{ }\mu\text{g/ml}$  であり、対照牛の  $1.458\pm0.391\text{ }\mu\text{g/ml}$  よりも有意 ( $p<0.01$ ) に低値であった (図 1.2.2)。さらに、3 群間の比較において (予後良好 VS 予後不良 VS 対照)、予後不良牛の血清中 Fe 濃度は  $0.751\pm0.583\text{ }\mu\text{g/ml}$  であり、予後良好牛の  $0.945\pm0.393\text{ }\mu\text{g/ml}$  に対して有意に低値を示した ( $p<0.05$ )。

次に ACM 罹患牛における血清中 Fe 濃度を指標とした ACM の予後診断能を評価するために ROC 解析を行った (図 1.2.3)。血清中 Fe の ROC 曲線下面積 (AUC) は  $0.713$  ( $p<0.05$ ) となり、ACM の予後不良を診断するための血清中 Fe 濃度におけるカットオフ値は  $<0.82\text{ }\mu\text{g/ml}$  であった。ACM の予後不良を診断するための血清中 Fe 濃度のカットオフ値における感度および特異度はそれぞれ  $77.8\%$  および  $70.0\%$  であった。

#### 1.2.4 考察

炎症の早期発見は臨床的診断、ハードヘルス、動物倫理上で重要である。ACM 罹患牛を供試した本試験では PIXE 法により 28 元素 (Na、Mg、Al、Si、S、Cl、K、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Ce、Ni、Cu、Zn、Ga、As、Se、Br、Rb、Sr、Y、Zr、Nb、Mo、Pb) が測定可能であった。前節において満足のいく精度が確認された 14 元素のうち ACM 罹患牛では健常牛と比較して血清中 Zn および Fe 濃度に有意差が認められた。しかしながら、ACM 罹患牛の予後の違いによる差を確認できたのは血清中 Fe 濃度の

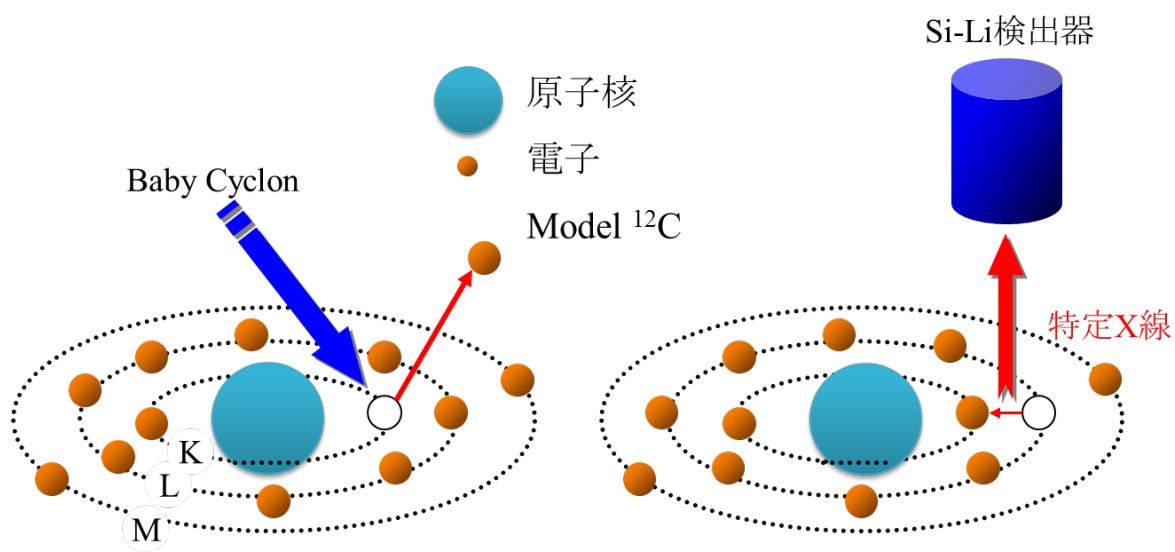
みであった。ACM 罹患牛における血清中 Fe 濃度の低下については多くの報告があり [7、11、26、50]、本試験も過去の報告を裏付ける結果であった。しかし血清中 Fe 濃度を指標に ACM 罹患牛における予後評価をした報告はほとんどない。そこで、本試験では ROC 解析を用いて ACM の予後を予測するための血清中 Fe 濃度のカットオフ値を求めた。その結果、血清中 Fe 濃度が  $<0.82 \mu\text{g/ml}$  であれば感度および特異度はそれぞれ 77.8% および 70.0% で ACM 罹患牛の予後は不良となることを示すことができた。本試験結果より、血清中元素を指標とした ACM 牛の予後診断において血清中 Fe 濃度は有用なツールとなり得ることが示唆された。

### 1.3 小括

第1章第1節では牛血清中微量元素濃度の多元素同時定性定量における PIXE 法の精度および正確度の検証を行った。その結果、スパイク結果に基づいて得られた回収率と CV 値は Mg を除いた 14 元素（Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、Mn、Ni、Pb、Se、Sr、Zn）において満足のいくものであった。本試験で使用した PIXE 法は牛の血清中微量元素濃度測定において迅速かつ信頼性の高い多元素定性定量法であることが明らかとなった。

PIXE 法により牛血清中の 14 元素濃度が正確にスクリーニングできることが保証されたことから、第1章第2節では ACM 罹患牛における PIXE 法を用いた血清中微量元素濃度のスクリーニング調査を行った。その結果、ACM 罹患牛の血清中 Fe および Zn 濃度は健常牛のそれと比較してそれぞれ有意に低値を示した。さらに予後不良牛の血清中 Fe 濃度は予後良好牛のそれと比較して有意に低値を示したことから、ACM 罹患牛の血清中 Fe 濃度測定は ACM 牛の予後診断能を有することが示唆された。エンドトキシン由来の炎症に伴い血清中 Fe 濃度が減少する機序を明らかにするためにも、生体の Fe 濃度の恒常性を司るヘプシジン[66、90]をも加味した調査が必要であると思われた。





#### PIXE法の利点

1. 多元素同時解析 (Na～U)
2. 試料を酸などで処理する必要がない (環境中元素汚染の危険性が低い)
3. 少量の試料でも測定可能 (ppm単位であれば、試料はpg単位で測定可能)
4. 高感度 (ppbレベル)

図 1.1.1 多元素同時定性定量法である粒子励起 X 線分析法の測定原理

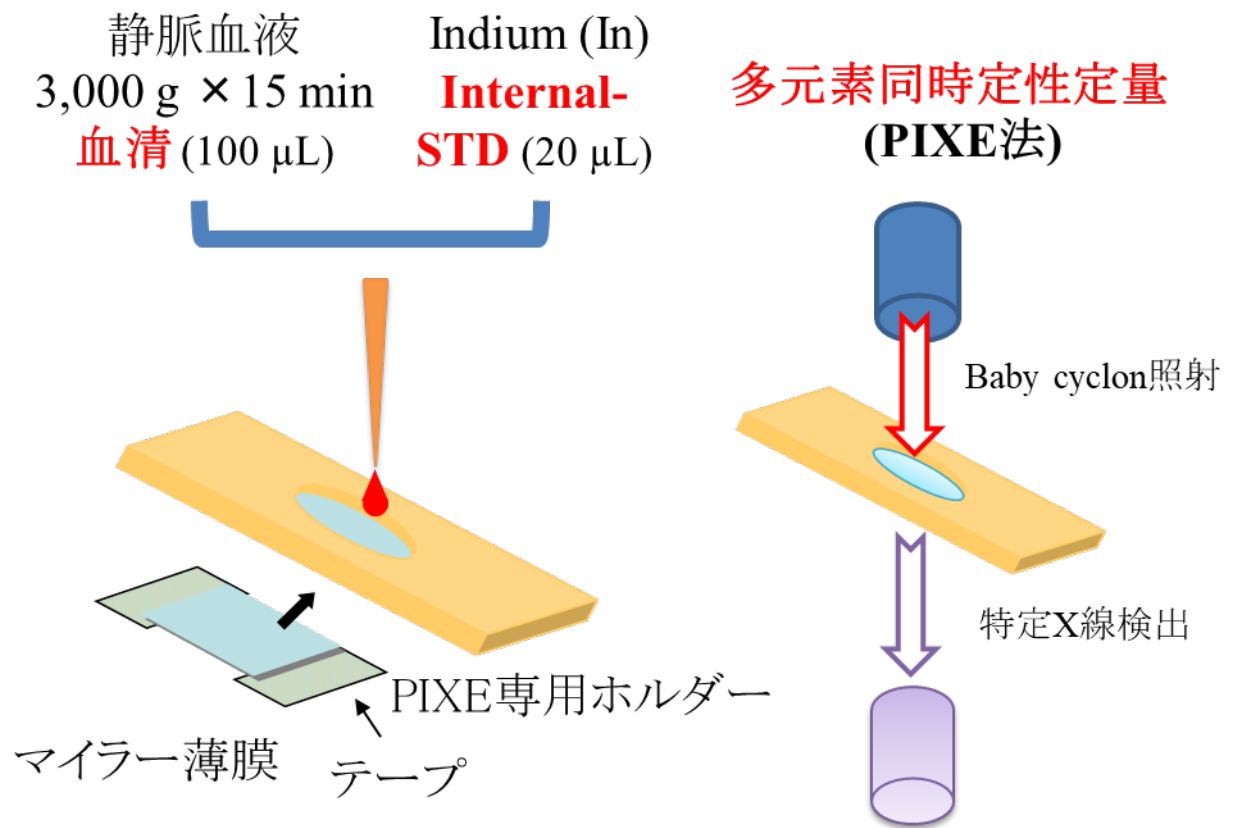


図 1.1.2 粒子励起 X 線分析法による血清中主要および微量元素濃度の測定手順

表1.1.1 PIXE法のスパイクおよび回収試験結果

標本 元素	蒸留水*				牛ブール血清				recovery (%)	
	Pre-Spike (μg/ml)		Post-Spike (μg/ml)		Pre-Spike (μg/ml)		Post-Spike (μg/ml)		actual	Standard
	mean ± SD	CV	mean ± SD	CV	mean ± SD	CV	mean ± SD	CV		
アルミニウム	ND**		10.644 ± 0.617	0.133	1.050 ± 0.096	0.092	11.901 ± 1.701	0.143	10.851	101.9
カルシウム	ND		10.439 ± 0.723	0.058	69.922 ± 9.299	0.133	93.469 ± 0.794	0.008	10.213	97.8
カドミウム	ND		8.312 ± 1.352	0.145	ND		8.578 ± 1.255	0.146	8.578	103.2
コバルト	0.000 ± 0.000	0.886	7.032 ± 0.284	0.040	0.027 ± 0.002	0.085	7.438 ± 0.286	0.038	7.411	105.4
クロム	ND		7.037 ± 0.854	0.121	0.029 ± 0.011	0.393	9.842 ± 0.237	0.024	9.814	139.5
銅	0.001 ± 0.001	0.814	7.921 ± 0.296	0.037	0.676 ± 0.108	0.160	8.620 ± 0.116	0.014	7.944	100.3
鉄	0.008 ± 0.002	0.194	7.341 ± 0.344	0.047	1.782 ± 0.115	0.064	9.678 ± 0.123	0.013	7.897	107.6
ガリウム	0.000 ± 0.001	1.732	8.493 ± 0.399	0.047	0.013 ± 0.012	0.959	8.763 ± 0.153	0.017	8.750	103.0
マグネシウム	0.167 ± 0.088	52.509	11.577 ± 4.1148	35.543	7.363 ± 2.721	0.370	20.588 ± 14.258	0.693	9.750	84.2
マンガン	ND		8.130 ± 0.377	0.046	ND		8.733 ± 0.160	0.018	8.733	107.4
ニッケル	0.001 ± 0.001	1.083	7.926 ± 0.292	0.037	0.007 ± 0.013	1.732	7.948 ± 0.256	0.032	7.941	100.2
鉛	0.008 ± 0.002	0.269	7.927 ± 0.229	0.029	0.848 ± 0.024	0.028	9.157 ± 0.467	0.051	8.309	104.8
セレン	0.001 ± 0.001	1.075	8.475 ± 0.363	0.043	0.116 ± 0.016	0.134	8.355 ± 0.123	0.015	8.238	97.2
ストロンチウム	ND		9.270 ± 0.506	0.055	0.238 ± 0.040	0.167	8.351 ± 0.341	0.041	8.113	87.5
亜鉛	Zn 0.013 ± 0.008	0.604	8.184 ± 0.402	0.049	1.110 ± 0.048	0.043	9.073 ± 0.357	0.039	7.963	97.3
* 蒸留水 (20 ml 注射用蒸留水、大塚製薬株式会社)										
** ND: 不検出										
Actual: プールした血漿のスパイク値、Standard: DWスパイクに基づく補正										
Pre-Spike: 多元素標準追加前のスパイク値										
Post-Spike: 多元素標準追加後のスパイク値										
mean±SD: 平均値±標準偏差										
CV: 変動係数										

表1.2.1 甚急性大腸菌性乳房炎罹患牛における血清中主要および微量元素濃度												
	対照牛			甚急性大腸菌性乳房炎罹患牛								
				総頭数			予後良好牛			予後不良牛		
	(n=39)			(n=53)			(n=35)			(n=18)		
Na	380.2	±	97.0	564.4	±	281.6	591.1	±	312.5	512.3	±	207.3
Mg	5.03	±	4.66	8.09	±	6.81	8.10	±	4.59	8.07	±	9.99
Al	4.98	±	2.41	2.32	±	2.56	2.12	±	2.41	2.71	±	2.86
Si	3.06 (0-16.8)			5.34 (0-20.9)			5.33 (0-20.9)			5.56 (0-14.0)		
S	500.6	±	105.5	573.0	±	157.4	595.9	±	175.7	528.3	±	103.9
Cl	1523.2	±	337.2	2033.5	±	764.0	2156.2	±	880.2	1795.0	±	380.8
K	93.1	±	18.8	125.2	±	36.9 <sup>a</sup>	133.0	±	40.0 <sup>a</sup>	109.9	±	24.6
Ca	67.6	±	13.0	62.8	±	19.3	65.4	±	21.8	57.9	±	12.5
Ti	0.049	±	0.136	0.033	±	0.066	0.041	±	0.072	0.017	±	0.050
V	0.037	±	0.054	0.047	±	0.063	0.052	±	0.070	0.036	±	0.046
Cr	0.076	±	0.053	0.080	±	0.055	0.078	±	0.052	0.085	±	0.061
Mn	0.011	±	0.034	0.017	±	0.038	0.022	±	0.044	0.007	±	0.023
Fe	1.458	±	0.391	0.879	±	0.470 <sup>b</sup>	0.945	±	0.393 <sup>b</sup>	0.751	±	0.583 <sup>b,c</sup>
Co	0.009	±	0.017	0.009	±	0.017	0.011	±	0.020	0.004	±	0.009
Ni	0.022	±	0.026	0.018	±	0.026	0.019	±	0.028	0.017	±	0.022
Cu	0.736	±	0.184	0.706	±	0.279	0.709	±	0.320	0.701	±	0.182
Zn	1.322	±	0.580	0.897	±	0.651 <sup>a</sup>	0.910	±	0.527 <sup>a</sup>	0.872	±	0.861 <sup>a</sup>
Ga	0.031	±	0.030	0.021	±	0.025	0.022	±	0.026	0.021	±	0.025
As	0.001	±	0.005	0.003	±	0.013	0.002	±	0.008	0.007	±	0.019
Se	0.097	±	0.062	0.067	±	0.046	0.068	±	0.047	0.065	±	0.044
Br	26.6	±	5.6	10.4	±	7.4 <sup>b</sup>	10.5	±	7.7 <sup>b</sup>	10.2	±	7.1 <sup>b</sup>
Rb	0.001	±	0.007	0.060	±	0.070	0.072	±	0.112	0.037	±	0.051
Sr	0.065	±	0.044	0.098	±	0.073	0.106	±	0.076	0.084	±	0.057
Y	0.023	±	0.043	0.032	±	0.052	0.039	±	0.062	0.018	±	0.021
Zr	0.062	±	0.073	0.073	±	0.115	0.083	±	0.129	0.053	±	0.078
Nb	0.019	±	0.042	0.023	±	0.052	0.023	±	0.057	0.022	±	0.044
Mo	0.045	±	0.066	0.066	±	0.095	0.068	±	0.106	0.061	±	0.071
Pb	0.052	±	0.076	0.053	±	0.057	0.055	±	0.056	0.049	±	0.060
a: $p<0.05$ vs 対照牛, b: $p<0.01$ vs 対照牛, c: $p<0.05$ vs 予後良好牛												

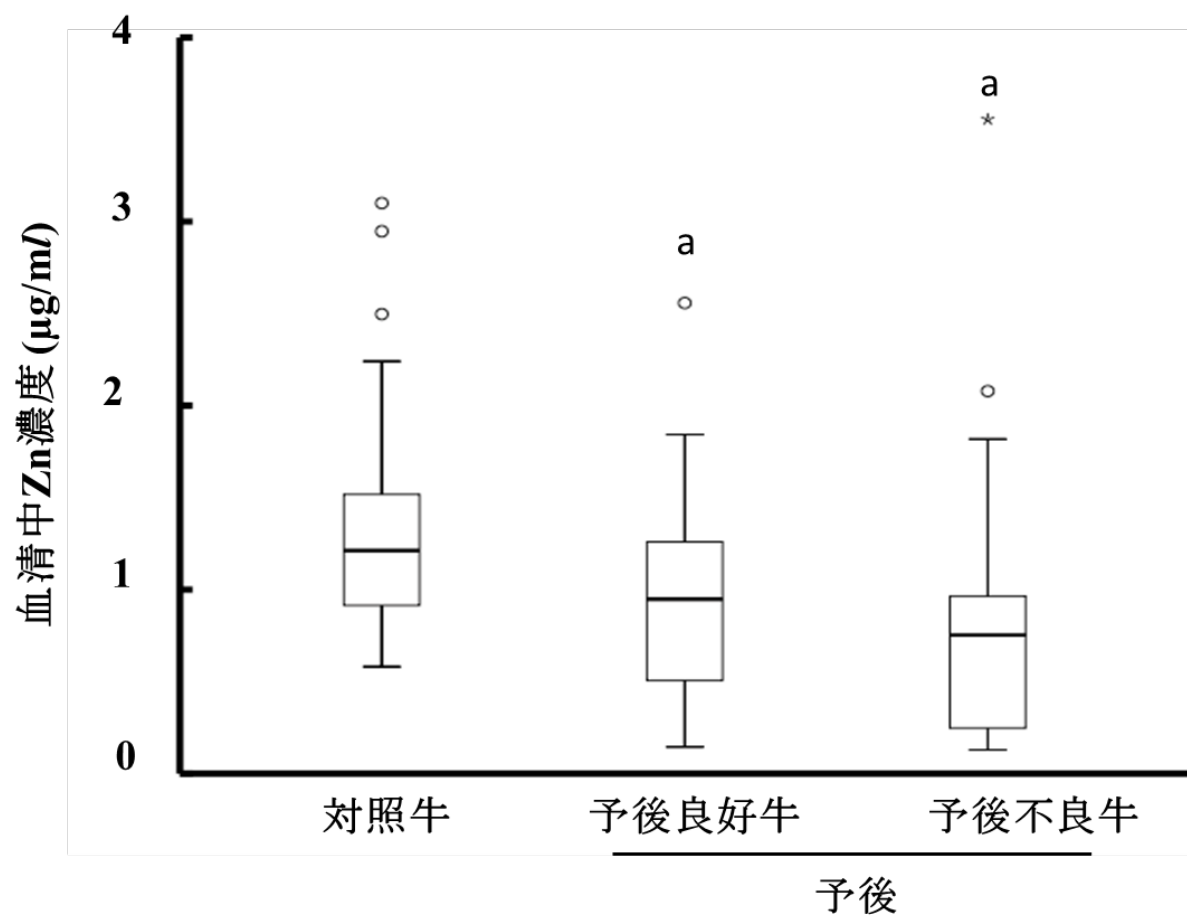


図 1.2.1 甚急性大腸菌性乳房炎罹患牛の血清中 Zn 濃度

*a*:  $p < 0.05$ , vs 対照牛.

対照牛 (n=39)、予後良好牛 (n=35)、予後不良牛 (n=18)

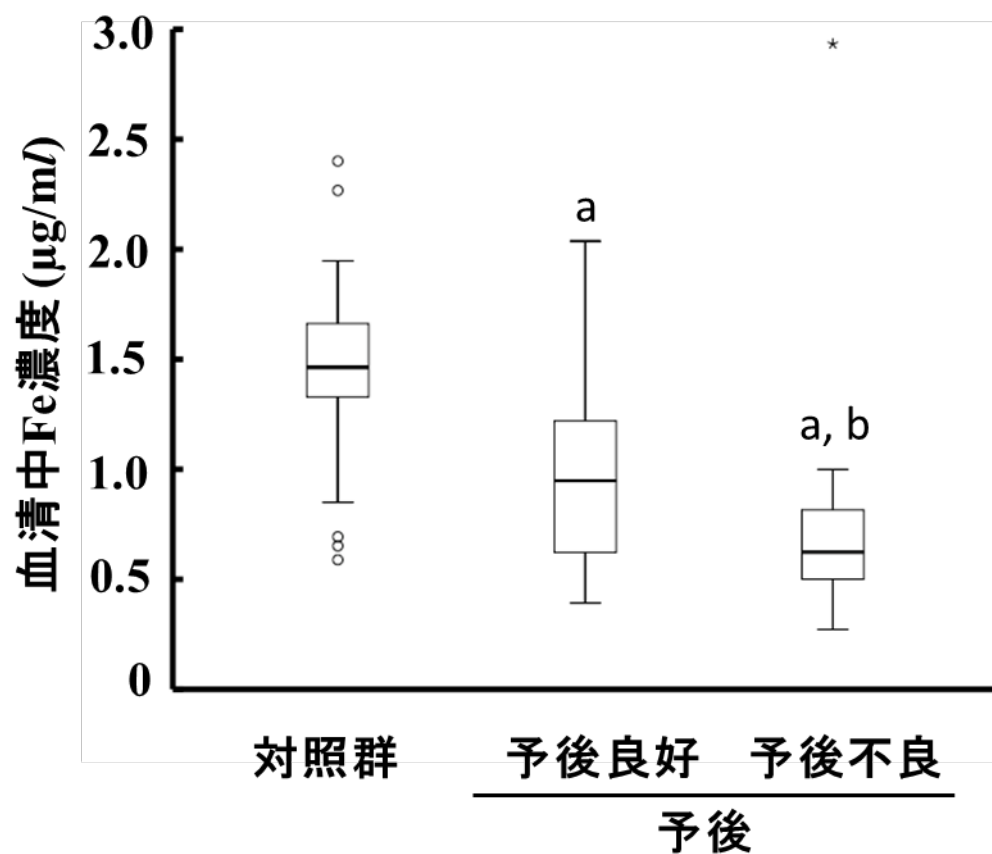


図 1.2.2 甚急性大腸菌性乳房炎罹患牛の血清中 Fe 濃度

a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$  vs 対照牛.

対照牛 (n=39)、予後良好牛 (n=35)、予後不良牛 (n=18)

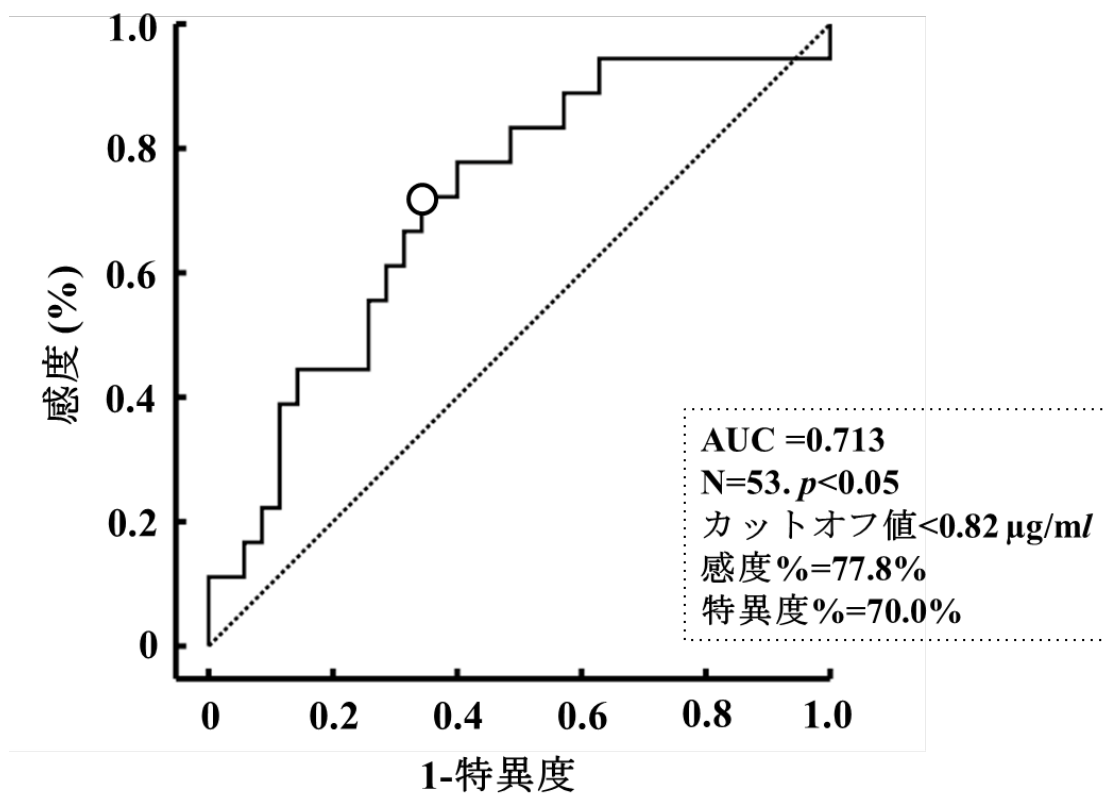


図 1.2.3 ROC 解析による血清中 Fe 濃度を指標とした**甚急性乳房炎罹患牛**の予後評価

## 第 2 章

エンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いた

血清微量元素動態と炎症との関係



エンドトキシンはグラム陰性菌の死滅や破壊によって血中などに遊離し炎症反応を惹起する[12]。その結果、ACM では全身症状として食欲不振、発熱、脱水、および乳生産量の減少が観察される。ACM に対する治療が奏功するかどうかは、早期診断および予後評価などの適切な判断に左右される。したがって、ACM の重症度を反映する鋭敏なバイオマーカーは臨床現場において有用であると思われる。

様々な酵素反応に関与し、宿主、病原体双方の必須元素[60]である Fe は急性炎症を呈した ACM 罹患牛において血清レベルで有意に低下する可能性を第 1 章で示した。その機序を理解する上で生体内における Fe の恒常性に不可欠なペプチドホルモンであるヘプシジンは重要であろう[3、66、90]。ヘプシジンは炎症に反応して主に肝細胞から分泌され[19、46、61、64、66]、その主な機能は Fe を隔離することである[90]。IL-6 は、炎症によるヘプシジン誘導における重要なメディエーターとして知られている[58]。さらに、人において IL-6 の投与によりヘプシジン分泌が増大し、血清中 Fe 濃度が減少することも確認されている[59]。人においては炎症に伴い肝臓組織中でのヘプシジンの発現が増加し、その結果血清中 Fe 濃度が減少することが証明されている[5、30]。しかし、エンドトキセミアなど炎症性疾患に罹患した牛でも同様の変化が起こるかどうかは明らかになっていない。

第 2 章第 1 節ではエンドトキシン誘発性全身性炎症モデルを用いた血清中主要および微量元素動態と炎症との関係について PIXE 法によりスクリーニング調査を行った。さらに、第 2 章第 2 節ではエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いて炎症、肝臓におけるヘプシジン遺伝子の発現および血清中 Fe 濃度の関係について調査を行った。

## 2.1 多元素同時定性定量法である PIXE 法を用いた実験的エンドトキシンショック牛の血清中 Fe および Zn 濃度の経時的変化

*E. coli* や *K. pneumoniae* による非特異的な全身性炎症はエンドトキシンに由来し、臨床現場では特に ACM による経済的損失は甚大である[44、45]。したがって、ACM をはじめとしたエンドトキシン由来の炎症性疾患において重症度を早期に診断することは臨床獣医師にとって重要な問題となる。もしエンドトキセミアの重症度を主要および微量元素を用いて安価に測定し評価することができるのであれば臨床獣医師にとって有用なツールとなると思われる。しかし、エンドトキセミアを呈した牛の血清中主要および微量元素の動態を調査した報告はほとんどない。したがって、第 2 章第 1 節ではエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いた血清中主要および微量元素動態と炎症との関係について PIXE 法によりスクリーニング調査を行った。

### 2.1.1 材料および方法

本試験は、酪農学園動物実験委員会の承認（Approval#：VC16C1）に基づいて実施した。チャレンジモデルとして 2 か月齢、体重  $74.5 \pm 1.0$  kg のジャージー種健常子牛 6 頭を供した。供試牛はすべて臨床徴候、食餌および飲水、排尿および排便に異常は認められなかった。チャレンジ前に、胸部聴診による異常呼吸音およびラッセル音、湿性の発咳、頸静脈努張、眼球突出、流涎、不整脈は観察されなかった。供試牛には配合飼料と乾草を給餌し、自由飲水とした。

頸静脈にカテーテルを留置し、その直後に  $2.5 \mu\text{g/kg}$  の O111:B4 LPS (L4391、Sigma-

Aldrich、St. Louis、MO、U.S.A.) を自家血清 10 ml に混和してボラス投与した (LPS チャレンジ)。自家血清中のエンドトキシン活性値は、リムルス比濁時間分析法 (KTA、Endosafe®KTA2、Charles River、Charleston、SC、U.S.A.) により測定したところ、その中央値は 152,641 (17,968 - 229,296) EU/頭であった。

LPS チャレンジ前およびチャレンジ後 0.5、1、2、4、8、12、24、48 時間目に頸静脈より 10 ml シリンジを用いて採血し、血清分離真空採血管およびヘパリン添加採血管に保存した。これらのサンプルは測定まで -80°C で保存した。エンドトキシンチャレンジの 2 週前に同様のスケジュールで前述の通り採血した群を対照とした。

血漿中エンドトキシン活性値はリムルス比濁時間分析法により測定した。血清中微量元素濃度は第 1 章と同様に、仁科記念サイクロترونセンター (岩手県滝沢村) において PIXE 法により測定した[71、72]。

### 2.1.2 統計解析

統計分析は市販のソフトウェア (IBM SPSS Statistics v.21 ; IBM Co、Armonk、NY、U.S.A.) を用いて行った。結果は平均値±標準偏差で示した。群間、時間ごとの主要および微量元素濃度の比較には二元配置分散分析を用いた。交互作用が見いだされた場合、従属変数はボンフェローニ検定を用いて群間および群内のそれぞれの各採材時間において比較し、 $F$  検定ののちに Student's  $t$  検定または Mann-Whitney  $U$  検定を用いて各採材時間の群間で比較した。有意水準 5 %未満を有意とした ( $p<0.05$ )。

### 2.1.3 結果

対照群および LPS 投与群における LPS 投与前の血漿中エンドトキシン活性値は、それぞれ  $0.03 \pm 0.003$  および  $0.03 \pm 0.01$  EU/ml であった。分散分析において、群間および時間において有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。LPS 投与群において血漿中エンドトキシン活性値は LPS 投与後 0.5 時間目に  $1.24 \pm 0.04$  EU/ml に達し、有意 ( $p < 0.001$ ) な上昇を示した後、投与後 4 時間には投与前の値へ復した (図 2.1.1)。

第 1 章第 1 節において PIXE 法において満足いく精度が確認された 14 元素 (Al、Ca、Cd、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Ga、Se、Sr、Pb、Zn) のうち、血清中 Fe と Zn 濃度においてのみ有意な変動を確認した。その他の 12 元素では観察期間中に有意な変動を認めなかった。

LPS 投与群における血清中 Fe および Zn 濃度の経時的変化をそれぞれ図 2.1.2 上図および下図に示した。LPS 投与前の血清中 Fe 濃度は  $1.16 \pm 0.52$   $\mu\text{g/ml}$  であったのに対して LPS 投与後 4 時間目の血清中 Fe 濃度は、 $1.63 \pm 0.95$   $\mu\text{g/ml}$  に達し ( $p < 0.05$ )、LPS 投与後 8 時間目には投与前値まで復した。その後、血清中 Fe 濃度は 24 時間後を最小値 ( $0.38 \pm 0.20$   $\mu\text{g/ml}$ 、 $p < 0.001$ ) とする有意な減少が認められ、これは 48 時間後まで維持した。一方、LPS 投与前の血清中 Zn 濃度は  $0.88 \pm 0.37$   $\mu\text{g/ml}$  であり、LPS 投与後 8 時間で血清中 Zn 濃度は  $0.18 \pm 0.07$   $\mu\text{g/ml}$  まで低下し ( $p < 0.01$ )、LPS 投与 12 時間後まで低値を維持した。

#### 2.1.4 考察

本試験ではエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いた血清微量元素動態と炎症との関係について PIXE 法によりスクリーニング調査を行った。その結果、血清中 Fe および Zn が他の元素よりもエンドトキシン由来炎症性疾患の診断の指標として優れていることが明らかになった。大腸菌群が放出するエンドトキシンにより炎症が引き起こされる ACM 罹患牛において、血清中 Fe 濃度が低下することは過去に報告されている[7、11、26、50]。本試験は ACM 罹患牛において、血清中 Fe 濃度の低下がエンドトキシン由来の炎症に起因していることを裏付ける結果となり、さらに血清中 Fe 濃度がエンドトキセミアの診断に有用なマーカーであることを示唆した。

一方で本試験では血清中 Zn 濃度の低下も確認された。Peretz らは[63]、慢性炎症性リウマチ性疾患を有する患者の血漿中 Zn 濃度が低値を示すのに対し、単核細胞の Zn 含有量は上昇していることを確認した。さらに、Zn の補給は炎症に影響を及ぼさなかった[63]。以上のことから Peretz らは、炎症性疾患を有する患者における Zn 濃度の減少は、Zn 欠乏状態よりもむしろ炎症過程に関連した元素の再分布の結果であると結論付けている。本試験でエンドトキシンをチャレンジした子牛の血清中 Zn 濃度の低下もまた、炎症過程に関連した再分布の結果であると推察される。

まとめると、牛においてエンドトキシンに起因する炎症性疾患を診断するマーカーとして、血清中 Fe および Zn 濃度が有用であることが明らかになった。今後は、エンドトキシンにより血清中 Fe 濃度が減少する機序を解明する一環としてヘプシジンとの関連性を評価する必要がある。

## 2.2 実験的エンドトキシンショック牛における血清中 Fe 濃度と肝臓中ヘプシジン遺伝子発現量の経時的变化

ヘプシジンは生体での血清中 Fe 濃度の恒常性に必須である。ヘプシジンは炎症に反応して主に肝細胞から分泌され[19、66]、その主な機能は Fe を隔離することである[90]。IL-6 は、人において炎症によるヘプシジン誘導の重要なメディエーターとして同定されている[58]。さらに人への IL-6 投与により、ヘプシジン分泌の促進と血清中 Fe 濃度の減少が引き起こされることが明らかとなっている[59]。しかしながら牛においても人同様に、炎症により血清中 Fe 濃度が低下する機序にヘプシジンが関与しているか否かを検証した報告はない。第 2 章第 2 節ではエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いて炎症、肝臓におけるヘプシジン遺伝子発現パターンおよび血清中 Fe 濃度の関係について調査を行った。

### 2.2.1 材料および方法

本研究は酪農学園大学動物実験委員会の承認（Approval#：VC15H2）に基づいて実施した。本研究では、日齢  $176.8 \pm 23.7$  日、体重  $178.7 \pm 33.0$  kg の雌雄各 5 頭のホルスタイン種育成牛を供試した。すべての供試牛は研究目的で本学に導入、飼養管理され、臨床徴候、食餌の摂取および飲水、排尿、排便および血液学的検査に異常は認められなかった。エンドトキシンチャレンジ前に、胸部聴診による異常呼吸音または、ラッセル音、湿性の発咳、頸静脈うっ滞、眼球突出、流涎、不整脈は観察されなかった。

供試牛には配合飼料と乾草を給餌し、自由飲水とした。

供試牛のうち 5 頭にエンドトキシン (LPS 投与群)、残り 5 頭に生理食塩液 (対照群) を投与した。エンドトキシンまたは生理食塩液の投与直前に頸静脈カテーテルを留置した。LPS 投与群には 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の O111:B4 LPS (L4391 ; Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、U.S.A) を自家血清 10 ml に混和調製した。また、対照群には生理食塩液 (生理食塩水 ; 日本全薬工業、福島、日本) 10 ml をそれぞれ頸静脈より投与した。エンドトキシンまたは生理食塩液の投与前 (pre)、投与後 0.5、1、2、4、8、12、24 および 48 時間において 10 ml を反対側の頸静脈より採血した。採血した血液は直ちに 10 ml の血清分離用真空採血管およびヘパリン添加採血管に分注した。血清および血漿はそれぞれ分注後 4  $^{\circ}\text{C}$  で保存し、3,000  $\times g$ 、15 分で遠心分離して得た。これらのサンプルは測定まで -80  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。第 10-11 肋間において 2.5 ml の 2 % リドカイン (キシロカイン注 2% ; アストラゼネカ、大阪、日本) により局所麻酔を行い、pre、投与後 0.5、1、2、4、8、12、24 および 48 時間において超音波ガイド下で肝生検を行なった。生検には 14G の生検針 (クイックカット C2 ; 株式会社八光、東京、日本) を用いた。肝生検により得た組織を直ちに RNeasy lysis reagent (Qiagen、Hilden、Germany) に浸漬し、採取後 24 時間以内に使い捨てホモジナイザー (bio-masher II ; 和光純薬工業、東京、日本) を用いてホモジナイズしたのち測定まで -80  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。測定の直前に血漿をエンドトキシンフリー蒸留水 (大塚蒸留水 ; 大塚製薬、東京、日本) を用いて 20 倍希釈し、ボルテックスミキサーで 10 秒間混和した。その後、阻害物質を不活化するため 80  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱した。血漿中エンドトキシン活性値はリム

ルス比濁時間分析法 (LAL-KTA: Limulus Amebocyte Lysate-Kinetic Turbidimetric; Charles River) により測定した。全ての測定には、エンドトキシンフリー蒸留水を陰性対照、リファレンススタンダード (CSE、Control Std Endotoxin; Charles River、Charleston、SC、U.S.A.) を 10,000 (EU) /バイアルに調製したエンドトキシンを陽性対照として使用した。 $\beta$ -グルカンによる反応阻害をさけるため、カイネティック比濁時間用 LAL 試薬 (Endosafe® KTA2; Charles River) を Endotoxin-Specific Buffer Solution (Charles River) により再融解した。LAL-KTA 法は 96 穴マイクロプレート (Endosafe® 96-well、flat bottom microplate M9001; Charles River) を用い、マイクロプレートリーダー (Sunrise™; Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) およびエンドトキシン測定ソフトウェア EndoScan-VTM (Charles River) により測定した。各測定では LAL 試薬の添付文書に従い、0.003 EU/ml から 3.0 EU/ml の範囲の検量線を作成した。検出限界値は 0.028 EU/ml であった。

血清中 Fe 濃度は、市販のキット (N-アッセイ LFe-H ニットーボー; ニットーボーメディカル、東京、日本) を用いて、波長 753 nm において全自動血液生化学アナライザー (LABOSPECT 003; 日立ハイテクノロジーズ、東京、日本) により Nitroso-PSAP 法により測定した。測定は 2 回行い、平均濃度を統計解析に用いた。

エンドトキシンチャレンジモデルより得た肝臓のヘプシジンおよび IL-6 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR [Polymerase Chain Reaction (Light-Cycler 480 system II; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) により測定した。逆転写およびリアルタイム PCR は市販のキット (Light-Cycler® Multiplex RNA Virus Master version 3; Roche



Diagnostics) を用いたワンステップ法により行なった。リアルタイム PCR は 96 穴プレートで行い、最終量は 20  $\mu$ l とした。PCR ミックスには 5  $\mu$ l のテンプレート RNA、各プライマー (リバーズおよびフォワード) 1  $\mu$ l (0.5  $\mu$ M)、ユニバーサルプローブ 0.4  $\mu$ l、RT-PCR reaction mix 4  $\mu$ l、RT-Enzyme solution 0.1  $\mu$ l および水 8.5  $\mu$ l を含む。牛へプシジンおよび IL-6 に対するプライマーおよびユニバーサルプローブは PubMed で遺伝子情報を得た後にロシュのホームページ ([https://lifescience.roche.com/global\\_en/brands/universal-probe-library.html](https://lifescience.roche.com/global_en/brands/universal-probe-library.html)) で設計をした。本研究で用いたプライマーおよびユニバーサルプローブを表 2.2.1 に示した。添付文書に従い、増幅条件は 50°C で 10 分 (逆転写)、95°C で 30 秒 (プレインキュベーション)、95°C で 5 秒および 60°C で 30 秒を計 45 サイクル (増幅) とした。結果は、リファレンス遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) -mRNA に対する相対発現量を市販のソフトウェア (E-method ; Roche Diagnostics) を用いて算出した。

## 2.2.2 統計解析

統計解析は市販のソフトウェア (IBM SPSS Statistics v.21 ; IBM Co、Armonk、NY、U.S.A.) を用いて行なった。データが正規分布する場合は平均値 $\pm$ 標準偏差、非正規分布の場合は中央値で示した。血漿中エンドトキシン活性値および血清中 Fe 濃度の群内および群間変数は二元配置分散分析を用いて分散を評価したのち、群間比較を Student's *t* 検定 (血清中 Fe 濃度、IL-6 mRNA およびへプシジン mRNA) および Mann-

Whitney *U* 検定（血漿中エンドトキシン活性値）を用いて解析した。また、pre 値に対する経時的变化は、Dunnett 検定を用いた。

### 2.2.3 結果

図 2.2.1 および 2.2.2 にエンドトキシンを投与した牛の血漿中エンドトキシン活性値および血清中 Fe 濃度の経時的变化をそれぞれ示した。Pre 値の血漿中エンドトキシン活性値は全ての牛で検出限界値以下であった（検出限界：0.028 EU/ml）。血漿中エンドトキシン活性値は、エンドトキシンチャレンジ後 0.5 時間目において  $1.239 \pm 0.881$  EU/ml を最高値とする有意な上昇を示した ( $p < 0.001$ )。その後、投与後 4 時間目に pre 値に復した。一方で、対照群の血漿中エンドトキシン活性値に有意な差は認められなかった。血清中 Fe 濃度の有意な経時的变化はエンドトキシンをチャレンジした牛でのみ認められた。エンドトキシンをチャレンジされた牛において、チャレンジ後 4 時間目に血清中 Fe 濃度は  $207.4 \pm 46.6$   $\mu\text{g/dl}$  に達し、pre 値と比較して有意に上昇したが、チャレンジ後 8 時間目までに pre 値に復した。その後血清中 Fe 濃度は投与後 24 時間目をピークに  $30.4 \pm 15.7$   $\mu\text{g/dl}$  まで低下し、pre 値と比較して有意な変動を示した ( $p < 0.001$ )。その結果、血清中 Fe 濃度は投与後 24 から 48 時間目において、pre 値と比較して有意に低値を維持した ( $p < 0.001$ )。

図 2.2.3 および 2.2.4 に肝臓における IL-6 およびヘプシジンの mRNA 発現量の経時的变化を示した。エンドトキシンをチャレンジされた牛において、チャレンジ後 2 時間目に肝臓における IL-6 の mRNA 発現量 (IL-6mRNA/GAPDH) は  $0.006 \pm 0.008$   $\mu\text{g/dl}$

に達し、pre 値 ( $0.0006 \pm 0.0005$ ) と比較して有意に上昇し ( $p < 0.01$ )、チャレンジ後 8 時間目まで有意に高値を維持した。同様にエンドトキシンをチャレンジされた牛において、チャレンジ後 2 時間目より肝臓におけるヘプシジンの mRNA 発現量 (ヘプシジン mRNA/GAPDH) は pre 値 ( $0.5 \pm 0.5$ ) と比較して有意に上昇し、チャレンジ後 8 時間目 ( $6.7 \pm 1.0$ ) をピークに、12 時間後まで有意に高値を維持した ( $p < 0.01$ )。

#### 2.2.4 考察

第 2 章第 2 節では、エンドトキシンチャレンジモデルを用いてエンドトキシン由来の炎症がヘプシジン発現を誘導し、血清中 Fe 濃度へ影響を及ぼすかどうかを調査した。エンドトキシンは toll-like receptor 4 シグナル伝達を活性化し、それによりマクロファージの IL-6 の産生を促進する[18]。Nemeth ら[58]は、ヘプシジンは IL-6 により誘導されるが、IL-1 または TNF- $\alpha$  によっては誘導されないことを示し、炎症によるヘプシジン誘導はヒトにおける II 型急性期反応であることを報告した。この炎症により惹起される IL-6-ヘプシジン経路によって血清中 Fe 濃度が調節を受ける。本研究の結果では、エンドトキシンを投与した牛の肝臓組織における IL-6 およびヘプシジン mRNA の発現は、エンドトキシン投与後 2~8 時間目で高レベルに維持され、その後エンドトキシン投与後 24 時間目でベースラインに復した。ヘプシジンおよび血清中 Fe 濃度の継時的変化は、IL-6 を投与した人において観察されたものと類似していた[12]。炎症に反応して血清中 Fe 濃度が急速に低下することは、宿主防御機構として説明できる[11]。生体内での Fe が隔離された結果生じる低 Fe 環境は細菌の増殖を制御

するため、生体の血液、リンパ液および滲出液における静菌または殺菌機構にとって不可欠である[87]。本試験の結果は、牛においても人と同様に炎症によりヘプシジン発現が誘導され、血清中 Fe 濃度が低下することを明らかにした。一方で、血清中 Fe 濃度の低下は、エンドトキシン投与後少なくとも 8 時間以内に確認することは困難であることが明らかとなった。Erskine ら[26]は大腸菌の乳房内感染後 20～24 時間で血清中 Fe 濃度の低下が認められたと報告している。本試験においても、エンドトキシン投与 24 時間後まで血清中 Fe 濃度の有意な減少を確認できず、Erskine らの報告を支持する結果となった。血清中 Fe 濃度を牛の炎症マーカーとして利用するためには疾病罹患後 24 時間以上経過している必要があると考えられた。

## 2.3 小括

第 2 章 1 節ではエンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いた血清中主要および微量元素動態と炎症との関係について PIXE 法によりスクリーニング調査を行った。その結果、牛においてエンドトキシンに起因する炎症性疾患を診断するマーカーとして、血清中 Fe および Zn 濃度が有用であることが明らかになったことから、エンドトキシンショックを呈した子牛において血清中 Fe および Zn 濃度が炎症を評価するための診断マーカーとして有用であることが示唆された。この Fe および Zn のうち、Fe は一般的な検査機関において 1 検体あたり 200～300 円で測定が依頼できるが、Zn は特殊な検査を必要とする。したがって、本研究の趣旨からも血液中 Fe 濃度を炎症マ-

カーとして抽出することが望ましいと思われた。

第2章第2節では、エンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いて炎症、肝臓におけるヘプシジン遺伝子の発現および血清中 Fe 濃度の関係について調査を行った。その結果、牛においてエンドトキシンによる炎症が肝臓におけるヘプシジン発現を誘導し、血清中 Fe 濃度を低下させることを明らかにした。さらに牛の炎症マーカーとして血清中 Fe 濃度を活用するためには疾病罹患後 24 時間以上経過している必要があることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、第3章では日常的な外科処置および ACM 症例を用いて炎症と血清中 Fe 濃度の関係を検証する。

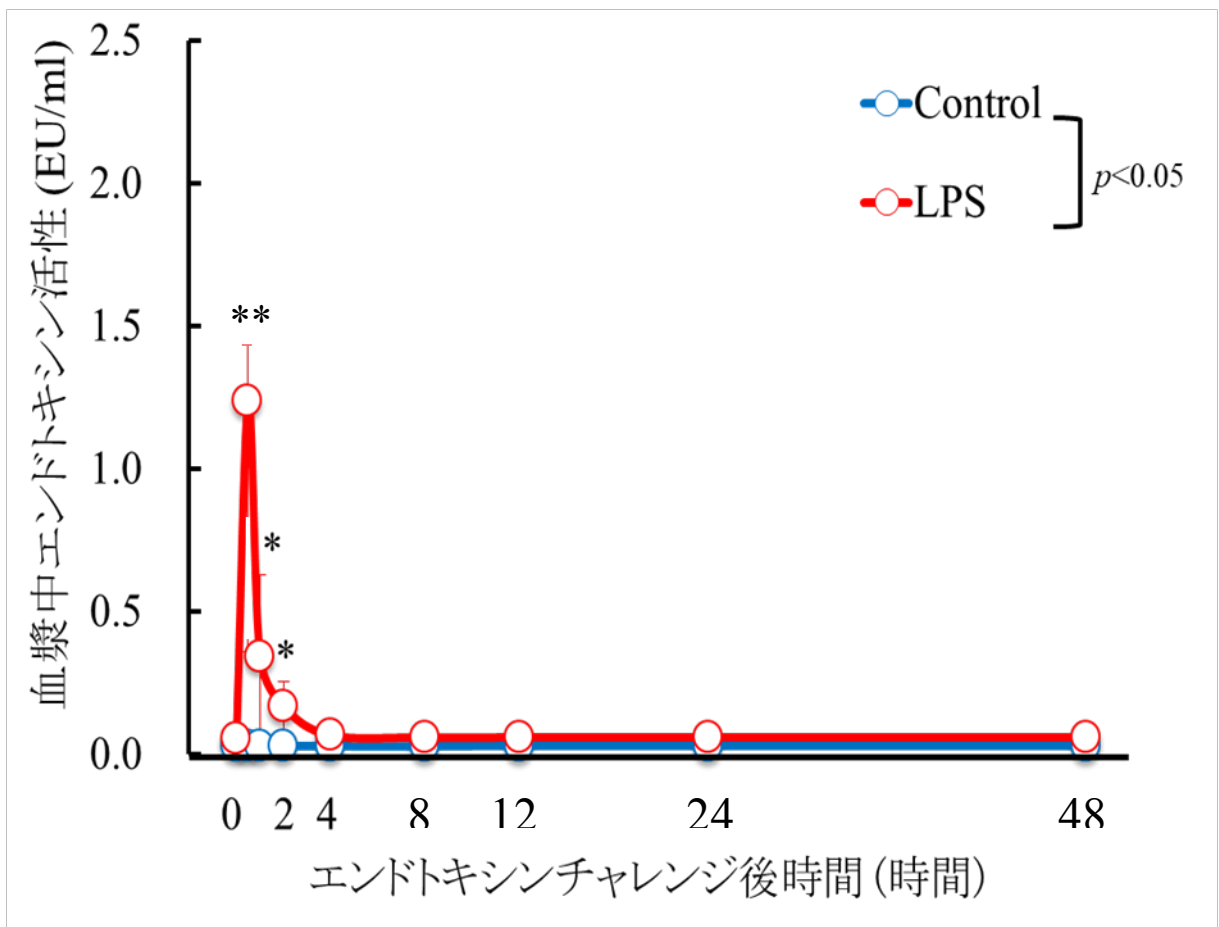


図 2.1.1 エンドトキシンチャレンジ子牛における血漿中エンドトキシン濃度の経時的変化

\*\*; vs pre,  $p < 0.01$

Control: 対照子牛

LPS: エンドトキシンチャレンジ子牛

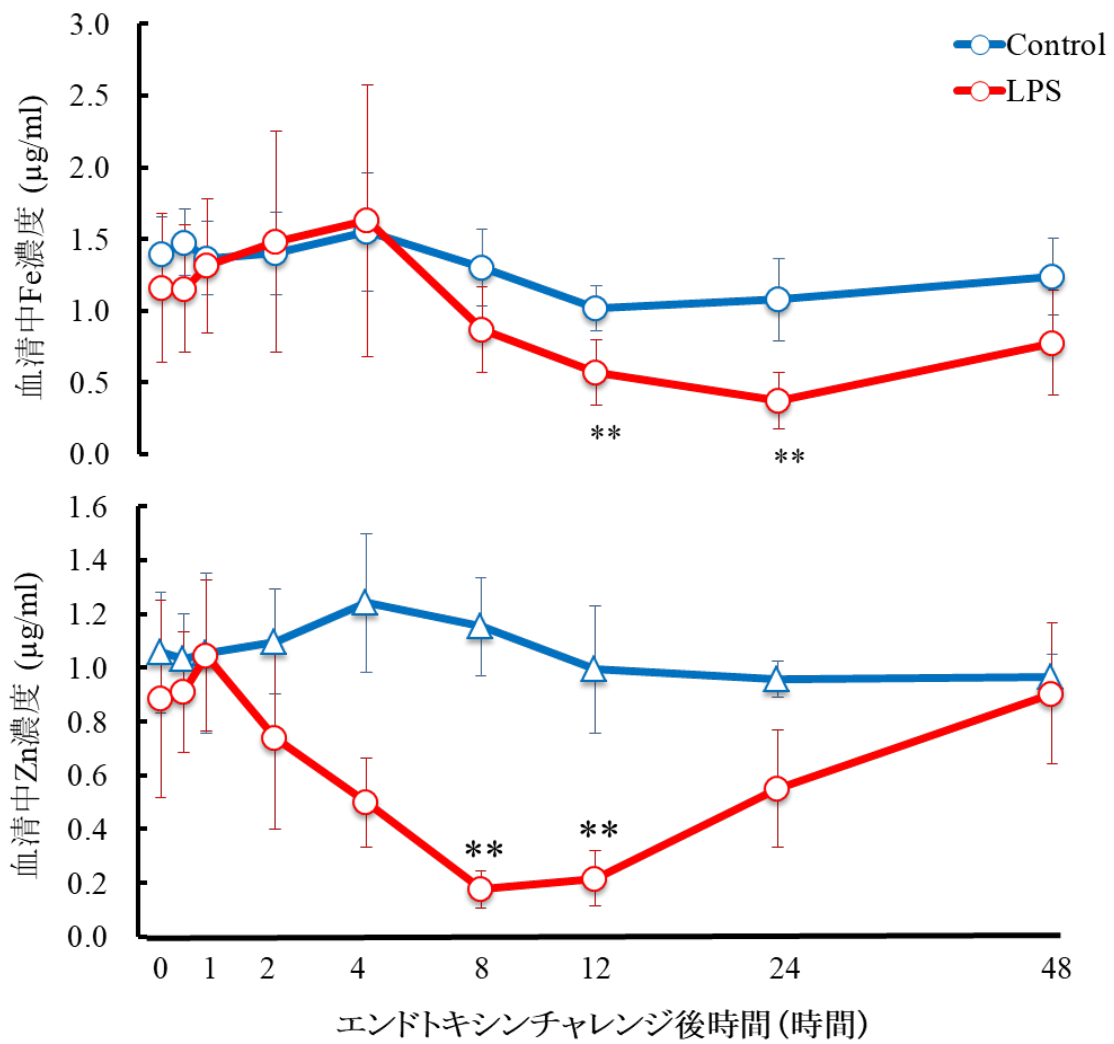


図 2.1.2 エンドトキシンチャレンジ子牛における血清中 Fe (上図)および Zn (下図)濃度の経時的変化

\*\*; vs pre,  $p < 0.01$

Control: 対照子牛

LPS: エンドトキシンチャレンジ子牛

表 2.2.1. 牛のヘプシジン、IL-6 および GAPDH-mRNA のプライマーおよびユニバーサルプローブ

				ユニバーサルプローブ
プライマー		Length	Sequence	No
ヘプシジン	Left	19	cctgccttctgctccttgt	111
	Right	20	ctgtgagctgtcgtgtctgg	
IL-6	Left	19	cactccattcgctgtctcc	9
	Right	24	ggtgtcatttttgaaatcttctcc	
GAPDH	Left	20	cacagtcaaggcagagaacg	9
	Right	20	ccacttgatgttggcaggat	



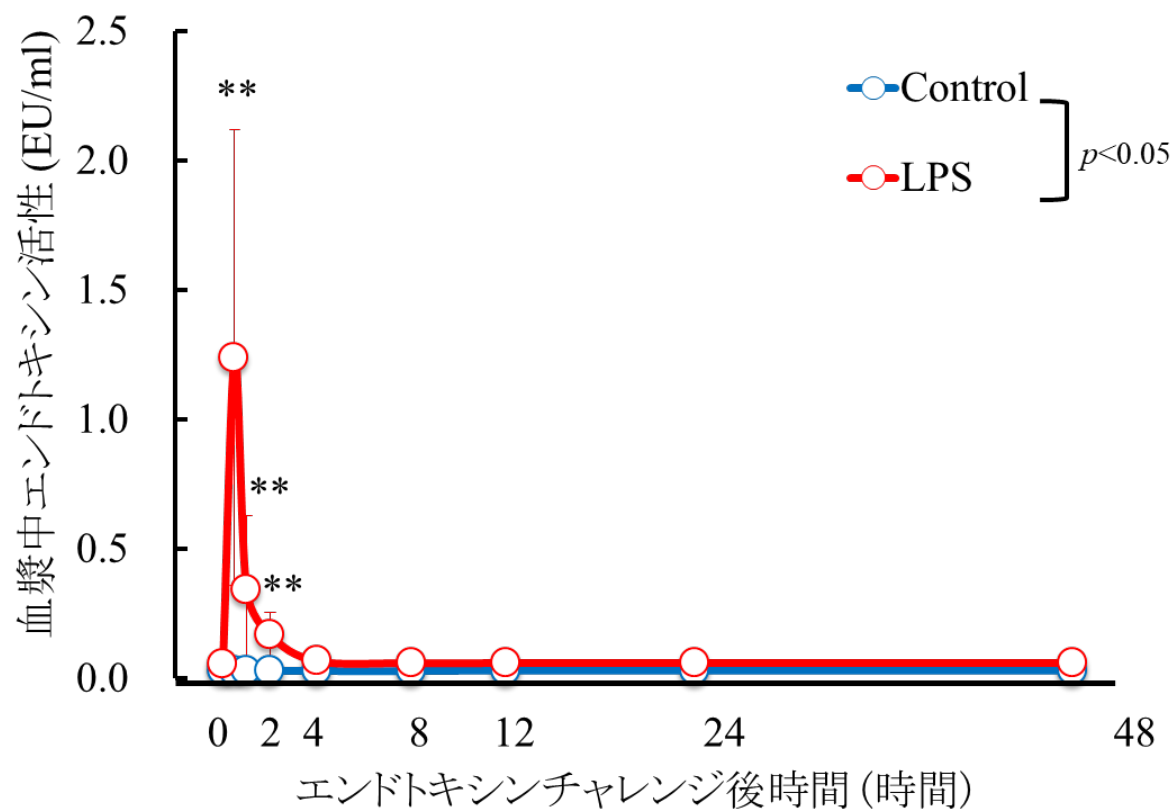


図 2.2.1 エンドトキシンチャレンジ子牛における血漿中エンドトキシン濃度の経時的変化

\*; vs pre,  $p < 0.05$ , \*\*; vs pre,  $p < 0.01$

Control: 対照子牛

LPS: エンドトキシンチャレンジ子牛

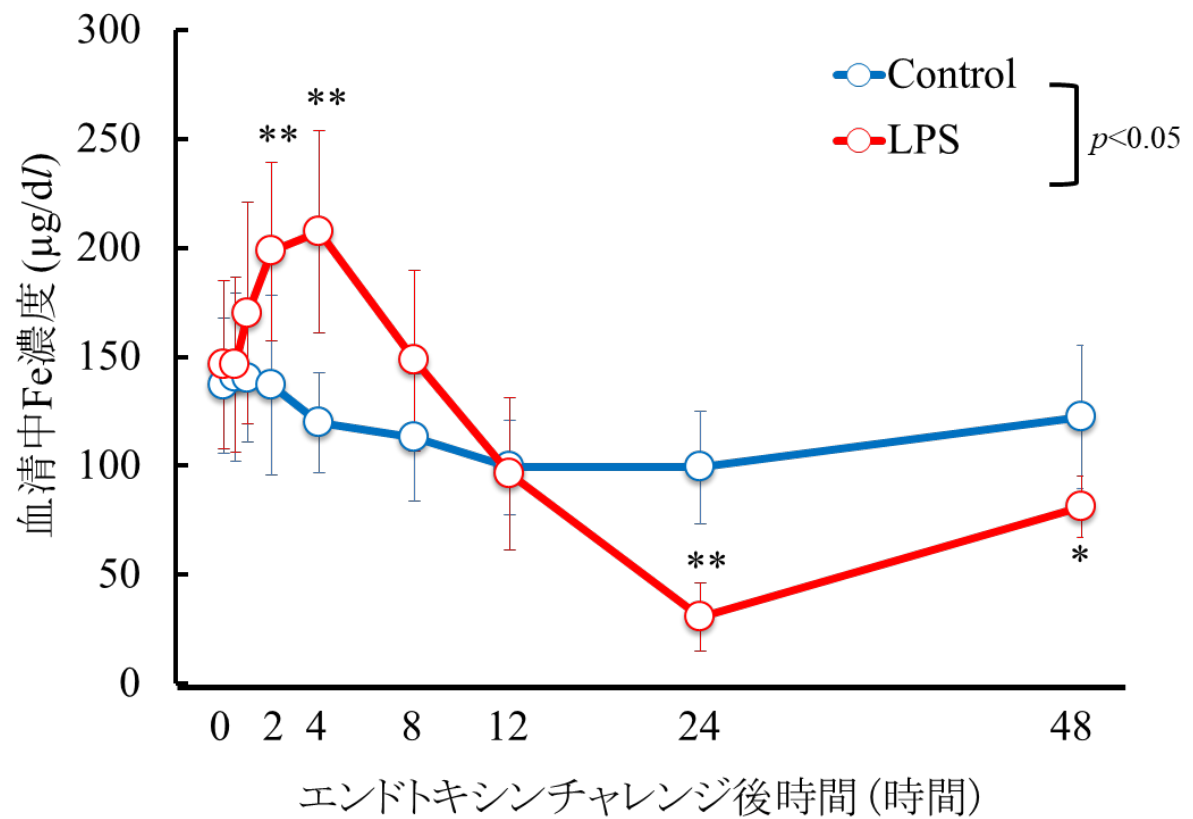


図 2.2.2 エンドトキシンチャレンジ子牛における血清中 Fe 濃度の経時的变化

\*; vs pre,  $p < 0.05$ , \*\*; vs pre,  $p < 0.01$

Control: 対照子牛

LPS: エンドトキシンチャレンジ子牛

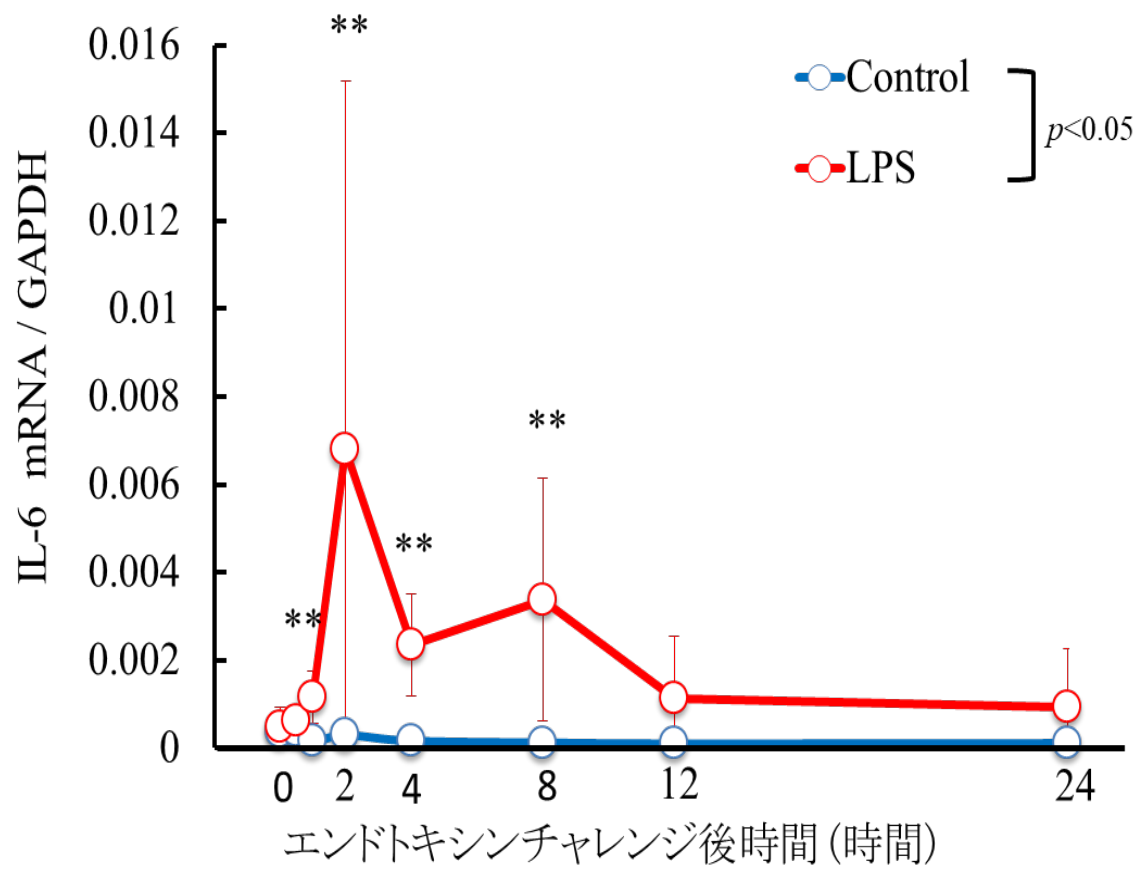


図 2.2.3 エンドトキシンチャレンジ子牛の肝臓組織中における IL-6 mRNA 遺伝子発現量の経時的変化

\*\*; vs pre,  $p < 0.01$

Control: 対照子牛

LPS: エンドトキシンチャレンジ子牛

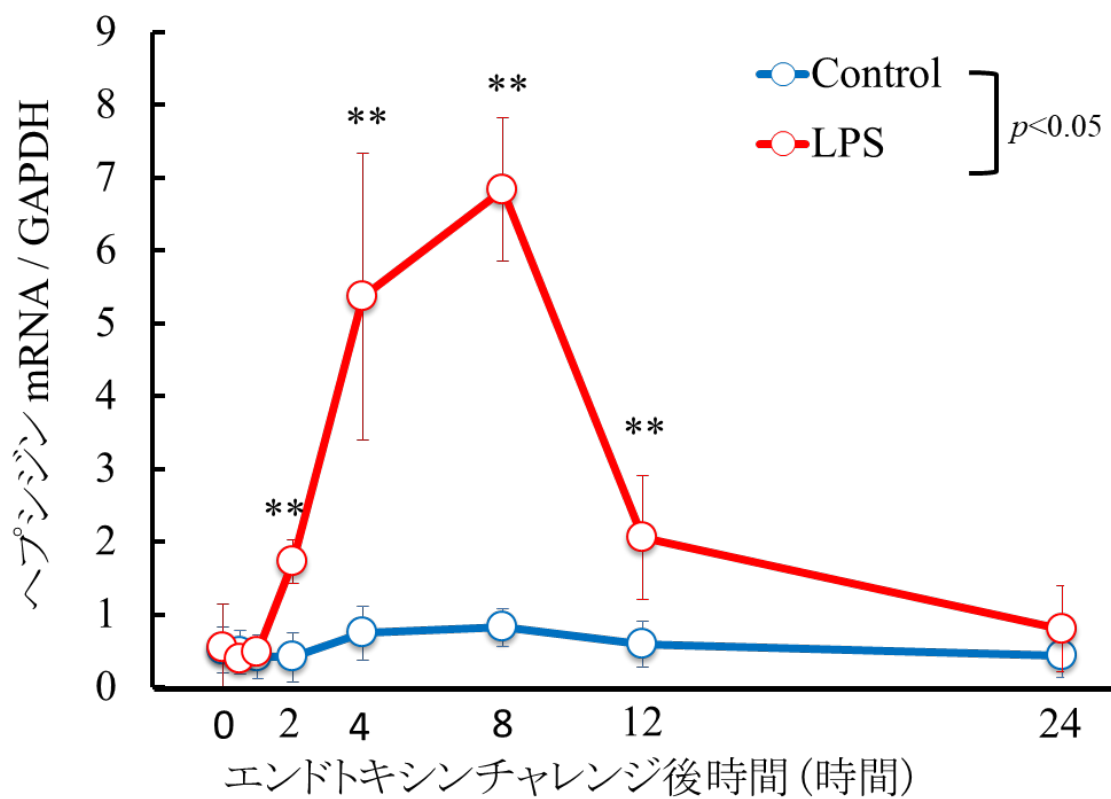


図 2.2.4 エンドトキシンチャレンジ子牛の肝臓組織中におけるヘプシジン mRNA 遺伝子発現量の経時的変化

\*\*; vs pre,  $p < 0.01$

Control: 対照子牛

LPS: エンドトキシンチャレンジ子牛

### 第 3 章

生化学検査機器による Nitroso-PSAP 法で測定した  
血清中 Fe 濃度を指標とした牛の炎症性疾患の評価

第1章において、血清中 Fe 濃度を PIXE 法により測定することは ACM 罹患牛の予後評価において有用なツールであることを示唆した。しかし、ベビーサイクロトロンを用いる PIXE システムの設置は制約が多く、臨床例において血清中 Fe 濃度を測定することは困難である。一方、Nitroso-PSAP 法 [34]は、原子吸光や誘導結合プラズマ質量分析計などの高価な機器を必要とせずに、水性サンプル中の Fe を定量するために確立された測定方法である。Nitroso-PSAP 法は1検体あたりの費用は200～300円と安価である。測定には市販のキットを使用するため操作時間は約15分であり、その後の自動分析装置による測定時間を含めても約30分で血清中 Fe 濃度が測定可能となる。したがって、Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度の測定は安価で容易に行えることから、獣医師による臨床症例に使用することができる。第3章では臨床検査機関で一般的に行われている Nitroso-PSAP 法により測定した血清中 Fe 濃度を用いて牛の炎症評価が可能か否かについて非感染性炎症として除角手術を受けた牛を、感染性炎症として ACM 罹患牛を用いてそれぞれ評価を行った。

### 3.1 牛のマイナーサージェリーにおける炎症マーカーとしての血清 Fe 濃度の有用性

実験室内全自動血液生化学検査（オートアナライザー）は最も汎用されている血液生化学機器であり、血清中 Fe 濃度も Nitroso-PSAP 法を用いればオートアナライザーで簡便かつ安価に測定することができる。したがって、PIXE 法などの特殊機器でなく一般的な Nitroso-PSAP 法で Fe 濃度を測定して炎症と血清中 Fe 濃度との関係性を評

価することは周術期における炎症反応を知る上で極めて有用である。しかし、周術期の牛における血清中 Fe 濃度に関する比較研究は行われていない。したがって、本研究はマイナーサージェリーとして一般的に行われている除角手術対象牛の血清中 Fe 濃度の経時的変化を検証し、炎症マーカーとして応用できるか否かを明らかにすることを目的とした。

### 3.1.1 材料および方法

本試験は National Research Council が 1996 に示した Guide for the Care and Use of Laboratory Animals[56]に準拠して試験計画し、酪農学園動物実験委員会の承認 (Approval#: VH15C21) に従って実施した。供試牛は酪農学園大学附属動物医療センターに除角依頼で来院した日齢  $205.0 \pm 10.7$  日、体重  $207.2 \pm 24.1$  kg のホルスタイン種牛 5 頭 (オス 3 頭、メス 2 頭) であった。鎮痛のため 1 mg/kg のキシラジン (セラクタール®2%注射液、バイエル薬品、大阪) を静脈内に投与した時間を  $t=0$  分とした。キシラジン投与の 2 分後に 5 ml の 2 %リドカイン塩酸塩 (静注用キシロカイン 2 %、アスペンジャパン、東京) を局所麻酔として両側の頬骨側頭神経の角への分枝部周囲に皮下注射した。除角および角基部の止血にはそれぞれバーネス除角器および除角用烙鉄を用いた。なお、すべての手技は 15 分以内に終了し、50  $\mu$ l /kg のアチパメゾール (アンチセダン、日本全薬工業、福島) を拮抗薬として  $t=15$  分において静脈内に投与した。すべての供試牛はアチパメゾール注射直後に起立した。

鎮静前 (pre)、 $t=0.5$ 、2、4、6、8、12、24 および 48 時間目に頸静脈より各 10 ml 採

血し血清分離管に保存し、常温で  $3000 \times g$ 、15 分遠心分離して血清を得た。血清は測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。急性炎症マーカーである SAA および血清中 Fe 濃度は自動分析装置（日立 7170S、日立、東京）を用いてそれぞれラテックス凝集免疫比濁法（SAA-1、栄研化学、東京）[5]および Nitroso-PSAP 法（N-アッセイ L Fe-H ニットーボー、日東紡績、東京）により測定した。

### 3.1.2 統計解析

各サンプルの SAA および Fe 濃度はそれぞれ 2 回測定し、それぞれの平均値を統計解析に用いた。統計解析には市販のソフトウェア（IBM SPSS Statistics v.21 ; IBM Co、Armonk、NY、U.S.A.）を用いた。結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。一元配置分散分析により各従属変数の平均値を比較したのち、post hoc テストとして Dunnett 検定により pre 値に対する比較を行った。また、血清中 SAA と血清中 Fe 濃度の相関性を評価するためにピアソンの順位相関検定を行った。すべての統計は  $p$  値が 0.05 以下を有意とした。

### 3.1.3 結果

除角を行ったすべての供試牛は他の合併症を発症することはなかった。除角をした牛の血清中 SAA および Fe 濃度の経時的変化を図 3.1.1 および図 3.1.2 に示した。血清中 SAA の pre 値は  $3.2 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$  であったが除角後に有意に上昇し、48 時間目において  $36.9 \pm 30.3 \mu\text{g/ml}$  の最高値に達した ( $p < 0.01$ )。血清中 Fe 濃度の pre 値は  $143.8 \pm 4.1$



μg/dl であり除角後から低下して 24 時間目に  $90.0 \pm 36.4$  μg/dl ( $p < 0.001$ ) の最低値に達した。なお、除角をした牛の血清中 Fe 濃度は、pre 値と比較して 12 ( $p < 0.05$ )、24 ( $p < 0.01$ ) および 48 時間 ( $p < 0.01$ ) でも有意に低値を示した。また血清中 Fe 濃度は血清中 SAA 濃度と有意な負の相関を示した ( $r^2 = 0.500$ 、 $p < 0.01$ 、図 3.1.3)。

#### 3.1.4 考察

牛における最も敏感な急性期タンパク質は SAA と Hp である[67]。本試験では、過去の報告[7]と同様に血清中 SAA レベルは非感染性炎症を有する牛においても上昇した。しかしながら Suojala ら[77]は、乳房炎の牛では SAA 濃度の変動が Hp の変動よりも遅いことを報告しており、本試験でも除角手術を受けた牛の血清中 SAA 濃度の変化が血清中 Fe 濃度のそれよりも緩やかであった。血清中 SAA 濃度よりも血清中 Fe 濃度は炎症に反応して急速に減少し、この反応は宿主の防御機構として説明することができる[11]。すなわち 細菌の増殖を抑制するために体内での Fe の隔離の結果である低 Fe 環境は、静菌システムが体内で機能するために不可欠であると考えられている[87]。これらの結果は、Nitroso-PSAP 法で測定した血清中 Fe 濃度の変動が血清中 SAA 濃度の変動と比較して優れた炎症のマーカーであることを示唆している。

### 3.2 甚急性乳房炎の予後と血清 Fe 濃度の関係

第 1 章では PIXE 法といった特殊機器によって測定した血清中 Fe 濃度を用いて ACM の予後を判定した。本研究は血清中 Fe 濃度の一般的な測定法である Nitroso-PSAP 法で測定した血清中 Fe 濃度を用いて ACM 罹患牛の予後評価が可能か否かを検証した。

#### 3.2.1 材料および方法

本実験は酪農学園動物実験委員会の承認（Approval#：VC15H2）および National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [56]に従って実施した。本研究は、ACM 罹患牛を用いた前向き臨床試験により評価した。ACM は獣医師による臨床所見に基づいて診断し、罹患乳房から採取した生乳からの *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumonia* の分離培養により確定診断した。これらの症例を治療（輸液および抗生物質療法）の結果に基づいて予後良好または、不良に分類した。予後不良群とは初診日から 7 日以内に死亡または淘汰となった牛とした。治療は主に 5.0 ml/kg での 7.2 %高張食塩液（高張食塩液 V-注射液、日本全薬工業株式会社、福島、日本）による輸液療法に加えて、硫酸カナマイシン（硫酸カナマイシン注射液 1000mg 「明治」、Meijiseika ファルマ、東京、日本）を第一選択薬とした抗菌療法であった。

研究には 42 頭の ACM 罹患ホルスタイン種乳用牛を供試した。このうち 24 頭が予後良好、18 頭が予後不良であった。対照群として、酪農学園大学で飼育されている乳

房炎に罹患していない健康牛 30 頭を用いた。初診日の治療前に頸静脈より 10 ml 採血し血清分離管に保管したのち、常温で 3,000 ×g、15 分間遠心分離後、血清を測定まで -80℃で保存した。血漿中エンドトキシン活性値および血清中 Fe 濃度はそれぞれ前述の LAL-KTA および Nitroso-PSAP 法で測定した。

### 3.2.2 統計解析

統計解析は市販のソフトウェア（IBM SPSS Statistics v.21 ; IBM Co、Armonk、NY、U.S.A.）を用いて行なった。結果が正規分布に従う場合は平均値±標準偏差、正規分布に従わない場合は中央値（範囲）で示した。

対照群と ACM 群の群間比較は、正規分布（血清中 Fe 濃度）および非正規分布（血漿中エンドトキシン活性値）データをそれぞれ Student's *t* 検定および Mann-Whitney *U* 検定を用いて行った。同様に 3 群（対照、予後良好、予後不良）の血清中 Fe 濃度および血漿中エンドトキシン活性値の各群間比較は Tukey-Kramer HSD 検定を使用した。また、予後不良群の診断能を ROC 曲線解析により評価し、さらに感度と特異度を理想的カットオフ値により決定した。すなわち、理想的カットオフ値は *J* インデックスに基づいて算出した [2、55]。 *J* インデックスとは ROC 曲線と対角線の距離と定義され、 $J = \text{maximum} [\text{sensitivity} + \text{specificity} - 1]$ により計算した。 *J* インデックスに対応する ROC 曲線のカットオフ点を理想的カットオフ値とした[2、55]。すべての統計学的解析は有意水準 5%未満を有意とした ( $p < 0.05$ )。

### 3.2.3 結果

42 頭中 10 頭で生乳から *K. pneumonia* が分離され、残りの 32 頭は *E. coli* に起因する乳房炎であった。しかし、この 2 種の菌による血漿中エンドトキシン活性値および血清中 Fe 濃度の有意な差は認められなかった。

図 3.2.1 に ACM に罹患した牛の血清中 Fe 濃度を示した。ACM に罹患した予後良好牛（60.8  $\mu\text{g/dl}$ 、最小-最大 1-155  $\mu\text{g/dl}$ 、 $p<0.001$ ）および予後不良牛（17.9  $\mu\text{g/dl}$ 、最小-最大 3-56  $\mu\text{g/dl}$ 、 $p<0.001$ ）の血清中 Fe 濃度は、それぞれ健常牛（149.9  $\mu\text{g/dl}$ 、最小-最大 95-226  $\mu\text{g/dl}$ ）と比較して有意に低値を示した。さらに予後良好牛および健常牛と比較して、予後不良牛では血清中 Fe 濃度が有意に低値を示した（ $p<0.001$ ）。血清中 Fe 濃度の予後に対する ROC 曲線下面積は 0.781 であった（ $p<0.001$ 、図 3.2.2）。ROC 解析に基づいた血清中 Fe 濃度による ACM 罹患牛の予後を診断するためのカットオフ値は <31.5  $\mu\text{g/dl}$  であった。血清中 Fe 濃度による ACM 罹患牛の予後評価へのカットオフ値の感度および特異度はそれぞれ 73.3 % および 94.1 % であった。

### 3.2.4 考察

本試験では、ACM に罹患した牛の血清中 Fe 濃度が 31.5  $\mu\text{g/dl}$  未満であれば予後不良となることが明らかとなった。Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度を用いた ACM 罹患牛の予後評価への診断能は ROC 解析より、ROC 曲線下面積（AUC）が 0.781 であることから、その精度は第 1 章第 2 節で示した PIXE 法によるそれと同等であることが確認された[73]。

しかしながら、本節における予後基準は第 1 章で示したのものよりも極めて低かった (31.5 vs 82.0  $\mu\text{g/dl}$ )。その結果、この研究では高い特異性が観察されたと考えられる。

急性外傷性呼吸器疾患[1]や跛行[76]などの ACM とは無関係のいくつかの要因も、牛の血漿中 Fe 濃度を変化させることが知られている。さらに、低タンパク血症、重度の Fe 欠乏症、および腎臓病は血漿中 Fe 濃度を低下させる可能性があり、これが偽陽性の結果につながる可能性も考えられる。同様に、溶血性貧血、鉄過剰症、および肝疾患は血漿中 Fe 濃度を増加させる可能性があり、それは偽陰性結果をもたらす可能性があるとの指摘もある[43]。これらのバイアスを避けるために、本試験では、臨床所見に基づいて血清中 Fe 濃度が増加する可能性のある合併症を認めなかった牛のみを供試した。しかしながら、複数の農場からの ACM 罹患牛がこの試験に含まれている。低タンパク血症などの栄養状態[43]も血液中 Fe 濃度を変化させるため、臨床例では農場での飼養管理の影響に注意が必要と考えられる。

### 3.3 小括

第3章では臨床検査機関で一般的に行われている Nitroso-PSAP 法により測定した血清中 Fe 濃度を用いて炎症の評価が可能か否かを除角手術および ACM 罹患牛を用いて評価した。すなわち第3章第1節では牛の除角手術における非感染性炎症マーカーとしての血清中 Fe 濃度の測定を行なった。その結果、血清中 Fe 濃度の減少は除角手術後 12 から 48 時間目で除角手術前値と比較して有意に低値を維持した。さらに、血清中 Fe 濃度は血清中 SAA 濃度と有意な負の相関を示した。したがって、Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度は簡便かつ安価な炎症マーカーとして応用できる可能性が示唆された。

第3章第2節では血清中 Fe 濃度の一般的な測定法である nitroso-PSAP 法で測定した血清中 Fe 濃度を用いて感染性炎症性疾患である ACM 罹患牛の予後評価が可能か否かを検証した。その結果、ACM 罹患牛の血清中 Fe 濃度は健常牛のそれと比較して有意に低値を示した。さらに、予後不良牛の血清中 Fe 濃度は予後良好牛のそれと比較して有意に低値を示した。血清中 Fe 濃度の AUC は 0.781 であり、これは PIXE 法[73]によるそれと同等であることが確認された。したがって、Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度測定は PIXE 法による測定と同様に ACM に罹患した牛の予後評価において有用な手段となることが明らかとなった。

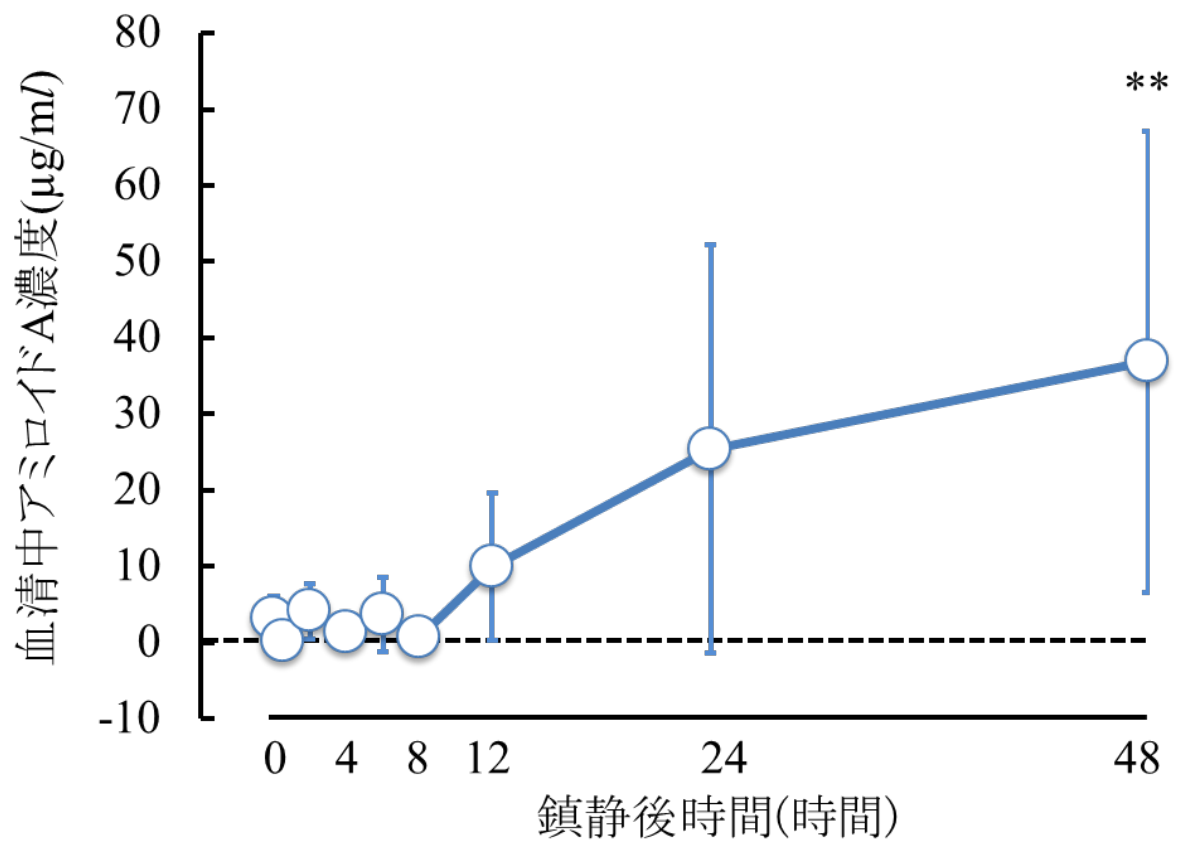


図 3.1.1 除角手術を受けた牛における血清中アミロイド A (SAA)濃度の経時的変化

\*, vs pre,  $p < 0.05$ , \*\*, vs pre,  $p < 0.01$

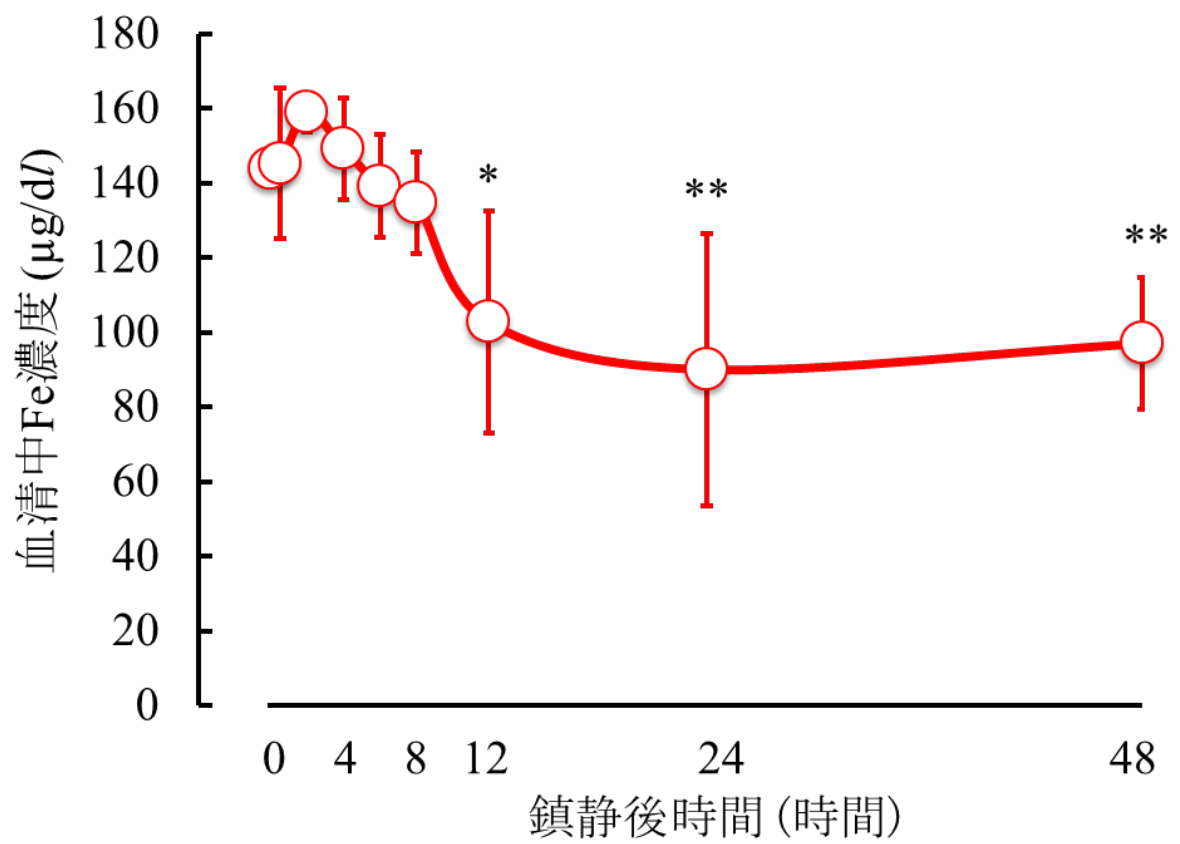


図 3.1.2 除角手術を受けた牛における血清中 Fe 濃度の経時的変化

\*, vs pre,  $p < 0.05$ , \*\*, vs pre,  $p < 0.01$



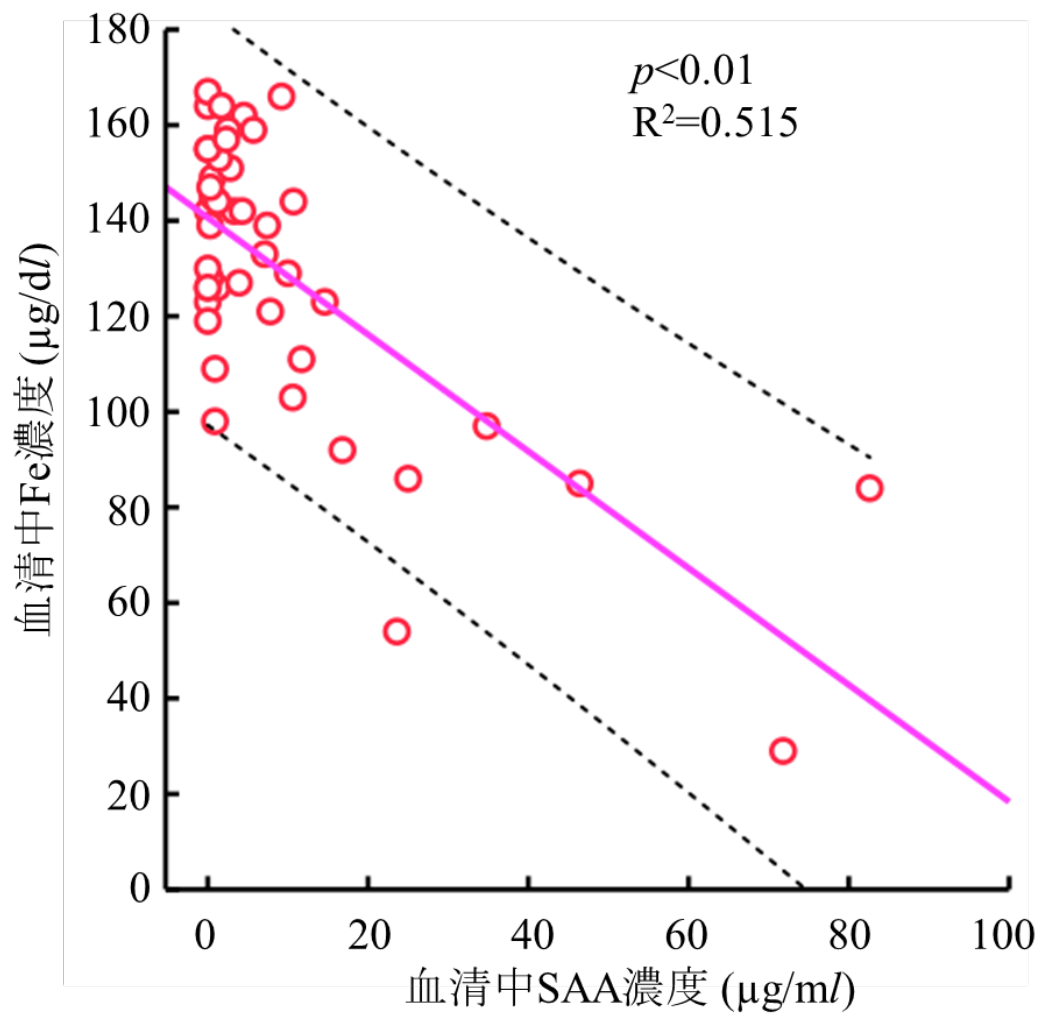


図 3.1.3 除角手術を受けた牛の血清中アミロイド A (SAA)濃度と血清中 Fe 濃度の関係

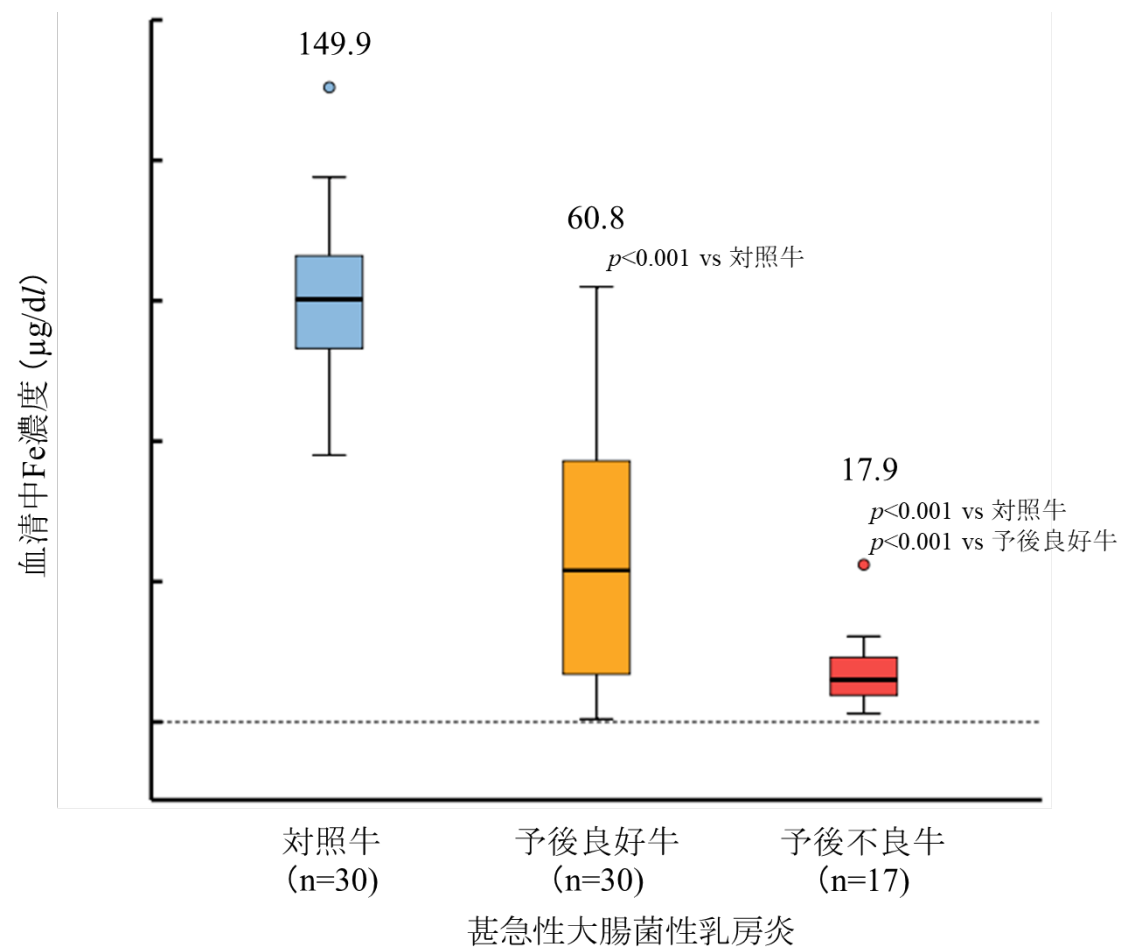


図 3.2.1 甚急性大腸菌性乳房炎罹患牛の血清中 Fe 濃度の比較

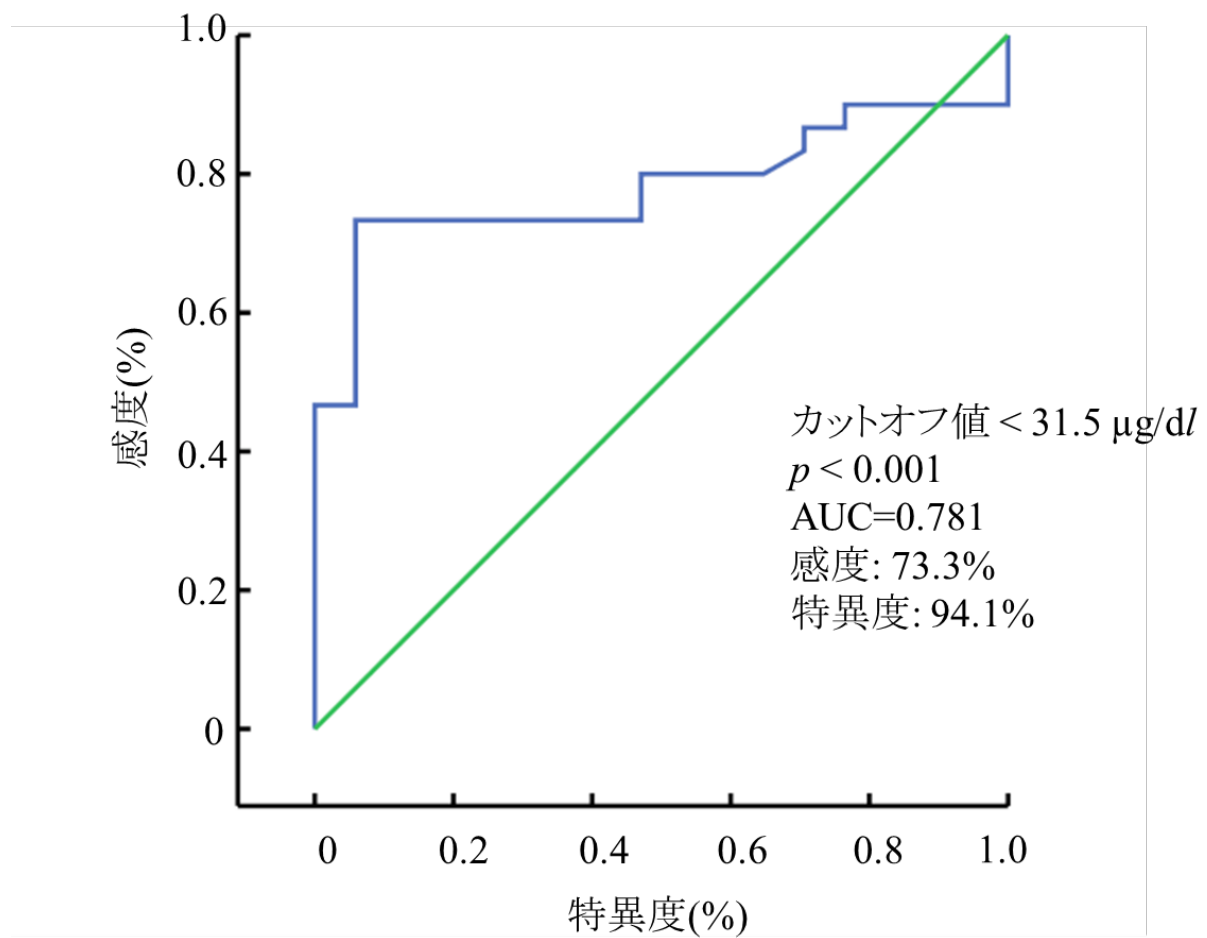


図 3.2.2 ROC 解析による血清中 Fe 濃度を指標とした**甚急性乳房炎罹患牛**の予後評価

## 総 括

本研究の目的は、牛の炎症性疾患において炎症に関連した血清中微量元素、特に血清中 Fe 濃度を代替のマーカーとして臨床応用することが可能か否かを評価するとともに、牛の炎症によって血清中 Fe 濃度が減少する機序の一部を明らかにすることを目的とした。加えて、本研究は生産性を重視した牛の臨床という制限のなかで如何に簡便かつ安価に正しい炎症状態を評価することができるか否かを検証した。

本研究で使用した PIXE 法は使いやすく、高速で信頼性の高い多元素同時定性定量分析ツールである[17]。この PIXE 法では、標的原子の内殻をイオン化する際に放出される特性 X 線を検出器が分析する。この PIXE 法は数  $\mu\text{g}$  のサンプルで ppm レベルの分析が可能であることが大きな特徴である[17]。また、PIXE 法は複雑なサンプルの前処理を必要としないため、本法の最大のメリットとしてサンプルの前処理中に生じるコンタミネーションのリスクが他の微量元素測定方法のそれよりも著しく低いことが挙げられる[79、80]。以前の研究では、PIXE 法を用いて病態生理学および病理学的条件下で、肝臓[29、33]、骨[24]、血漿[14、81、82]、血清[29、47]などの生体試料中の微量元素濃度が評価されており、多くの種の生体試料での研究が行われている。

第 1 章第 1 節では牛血清中微量元素濃度の多元素同時定性定量における PIXE 法の精度および正確度の検証を行った。その結果、スパイク結果に基づいて得られた回収率と CV 値は、Mg を除いた 14 元素（Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、Mn、Ni、Pb、Se、Sr、Zn）において満足のいくものであった。本研究で使用した PIXE 法は牛の血清中微量元素濃度測定において迅速かつ信頼性の高い多元素定性定量法であることが確認された。PIXE 法により牛血清中の 14 元素濃度が正確にスクリーニングで

きることが保証されたことから、第 1 章第 2 節では ACM における PIXE 法を用いた血清中微量元素濃度のスクリーニング調査を行った。その結果、ACM 罹患牛の血清中 Fe および Zn 濃度は健常牛のそれと比較して有意な差を認めた。さらに、予後不良牛の血清中 Fe 濃度は予後良好牛のそれと比較して有意に低値を示した。血清中 Fe 濃度の AUC は 0.713 となり、ACM の予後不良を診断するための血清中 Fe 濃度におけるカットオフ値は  $<0.82 \mu\text{g/ml}$  であれば感度および特異度はそれぞれ 77.8%および 70.0%で ACM 罹患牛の予後は不良となることを示すことができた。したがって、PIXE 法による ACM 罹患牛の血清中 Fe 濃度の測定は予後診断において有用な手段となることが明らかとなった。

ACM の主要な病態はグラム陰性菌由来のエンドトキシンによる IMI であると考えられている[37]。しかしエンドトキセミアを呈する牛の血清中主要および微量元素の動態を調査した報告はほとんどない。第 2 章第 1 節では PIXE 法を用いて、実験的エンドトキシンショック牛の血清中主要および微量元素濃度の経時的変化を観察した。その結果、血清中 Fe および Zn 濃度はエンドトキシンチャレンジ後 8 から 24 時間目でそれぞれチャレンジ前値のそれらと比較して有意に低値を示した。したがって、血清中 Fe および Zn 濃度はエンドトキシンショックの診断用マーカーになり得ることが示唆された。我々は Fe と Zn という炎症評価に有用と思われる微量元素の抽出に成功した。しかし、牛の臨床という経済、労力および時間的制約のある環境において選べる微量元素は Fe だけとなる。つまり、血清中 Fe 濃度は Nitroso-PSAP 法という極めて一般的な測定方法が確立されており、検査機関に依頼検査しても 1 検体あた

り 200～300 円と安価である。よって本研究では Fe に焦点をあてることとした。

生体内の Fe 代謝は肝臓においてヘプシジンにより制御されていることは周知されている[3、66、90]。さらにヘプシジンの産生は人において炎症により増加することが知られている[59]。しかしながら牛においても人同様に、炎症により血清中 Fe 濃度が低下する機序にヘプシジンが関与するか否かは不明である。第 2 章第 2 節では、実験的エンドトキシンショック牛における血清中 Fe 濃度と肝臓中ヘプシジン遺伝子発現量の経時的変化の観察を行った。その結果、肝臓における IL-6 およびヘプシジンの mRNA 発現量は、エンドトキシンチャレンジ後 2 から 8 時間目でそれぞれチャレンジ前値と比較して有意に高値を維持した。血清中 Fe 濃度の減少はチャレンジ後 24 から 48 時間後で、チャレンジ前値と比較して有意に低値を維持した。したがって、牛においても人同様に炎症によりヘプシジン発現が誘導され、その後に血清中 Fe 濃度が低下するものと思われた。これらの結果は牛の炎症マーカーとしての血清中 Fe 濃度には診断適期があり、それは疾病罹患後 24 時間以降であることを示唆している。これらの結果を踏まえ、牛における様々な炎症性疾患においても血清中 Fe 濃度がバイオマーカーになり得ると思われる。血清中 Fe 濃度が牛の炎症マーカーとして有用であることが示された一方で、いかに臨床応用するかが重要である。つまり、PIXE 法という特殊検査でなく Nitroso-PSAP 法という極めて一般的な血清中 Fe 濃度の測定でも、これまでの研究結果と同様であるかを検証しなければならない。

第 3 章では外科処置および ACM 症例を用いて炎症と Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度の関係を検証した。すなわち第 3 章第 1 節では牛の除角手術における炎症

マーカーとしての血清中 Fe 濃度の測定を Nitroso-PSAP 法により行なった。その結果、血清中 Fe 濃度の減少は除角手術後 12 から 48 時間目で除角前値と比較して有意に低値を維持した。さらに、血清中 Fe 濃度は血清中 SAA 濃度と有意な負の相関を示した。したがって、Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度は簡便かつ安価な簡易炎症マーカーとして応用できる可能性が示唆された。第 3 章第 2 節では血清中 Fe 濃度の一般的な測定法である Nitroso-PSAP 法で測定した血清中 Fe 濃度を用いて ACM 罹患牛の予後評価が可能か、さらには第 1 章の PIXE 法による結果と同様かを検証した。その結果、ACM 罹患牛の血清中 Fe 濃度は健常牛のそれと比較して有意に低値を示した。さらに、予後不良牛の血清中 Fe 濃度は予後良好牛のそれと比較して有意に低値を示した。血清中 Fe 濃度の AUC は 0.781 であり、これは PIXE 法[73]によるそれと同等であることが確認された。したがって、Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度測定は PIXE 法による測定と同様に、ACM 罹患牛の予後評価において有用な手段となることが明らかとなった。

これらの結果をまとめると、以下のことが明らかとなった。

1. PIXE 法は牛の血清中微量元素濃度測定において迅速かつ信頼性の高い多元素定性定量法である[74]。
2. ACM 罹患牛の PIXE 法による血清中 Fe 濃度の測定は予後評価において有用な手段となる[73]。
3. 血清中 Fe 濃度はエンドトキシンショックの診断用マーカーになり得る[74]。



4. 牛においても人同様に炎症による血清中 Fe 濃度の低下には肝臓組織におけるヘプシジン発現が関与している。
5. 牛の炎症マーカーとしての血清中 Fe 濃度には診断適期があり、それは疾病罹患後 24 時間以降である。
6. 除角手術における Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度は、簡便かつ安価な炎症マーカーとして応用できる可能性がある[83]。
7. 一般的な測定法である Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度は ACM 罹患牛の予後評価において有用な手段となる。

本研究は血清中 Fe 濃度を牛の炎症性疾患における炎症マーカーとして利用できることを科学的根拠に基づいて検証したものである。特に Nitroso-PSAP 法による血清中 Fe 濃度の測定は簡便かつ安価に実施できることから、すぐにでも臨床現場で応用可能である。しかし、血清中 Fe 濃度は炎症以外にも低タンパク血症、肝臓疾患、腎臓疾患等の影響を受けることが人においては知られている[43]。牛の血清中 Fe 濃度に影響を与える炎症以外の要因を継続して調査することは、臨床現場における血清中 Fe 濃度による炎症評価の精度をより高めるであろう。

## 謝 辭

稿を終わるに臨み、本研究に際して終始ご指導ご助言を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 鈴木一由 教授（主査）、研究の機会を提供していただきました酪農学園大学 小岩政照 名誉教授に深謝いたします。PIXE の測定およびご指導を賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所高エネルギー医学研究部門 世良耕一郎 教授に深謝致します。また、仕事の傍らの研究活動にもかかわらず理解をいただいたみなみ北海道農業共済組合 石狩支所 篠田浩二郎 次長、研究遂行及び論文執筆において多大なご支援を賜りましたみなみ北海道農業共済組合 道南支所 塚野健志 係長に心から感謝いたします。

本研究の遂行において多大なご協力とご助言を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 寺岡宏樹 教授（副査）および萩原克郎 教授（副査）に深謝いたします。

本研究において採材、サンプル測定、論文製作、学会発表など終始にわたり御協力を頂いた酪農学園大学獣医学研究科 西康暢氏、福田達也氏、大塚まりな氏および北出泰之氏に心から感謝いたします。そして、本研究を遂行する上で多大なご協力を賜りましたみなみ北海道農業共済組合の元同僚諸氏、酪農学園大学獣医学群獣医学類生産動物医療分野生産動物外科学ユニット所属学生諸氏、臨床症例を提供していただいたみなみ北海道農業共済組合管内の生産者諸氏に心から感謝いたします。

最後に、長期に渡り経済的ならびに精神的に支えてくれた母 睦子および妹 麻衣子に親愛の念を込めて謝意を表します。

## 利益相反

本主論文で開示すべき利益相反（COI : Conflict of interest）において、以下の研究助成を受けたことを開示いたします。

This study was supported by a Grant-in-Aid for Science Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (no. 26450431), and by a Grant-in-Aid from the Kieikai foundation awarded to K. Suzuki.

## 引 用 文 献

1. Aich, P., Babiuk, L. A., Potter, A. A. and Griebel, P. 2009. Biomarkers for prediction of bovine respiratory disease outcome. *OMICS*. **13**:199-209.
2. Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 3: receive operating characteristic curves. *Acta. Paediatr*. **96**: 644-647.
3. Anderson, G. J., Frazer, D. M. 2017. Current understanding of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* **106**: 1559S-1566S.
4. Andriopoulos, B. Jr., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S. A., Chen, S., Grgurevic, L., Knutson, M. D., Pietrangelo, A., Vukicevic, S., Lin, H. Y. and Babitt, J. L. 2009. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* **41**: 482-487.
5. Arezes, J. and Nemeth, E. 2015. Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *Int. J. Lab. Hematol.* **37 Suppl 1**: 92-98.
6. Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J., Beiboer, M. L., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* **81**: 411-419.
7. Baydar, E. and Dabak, M. 2014. Serum iron as an indicator of acute inflammation in cattle. *J. Dairy Sci.* **97**: 222–228.
8. Beaudeau, F., Fourichon, C., Seegers, H., Bareille, N. 2002. Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. *Prev. Vet. Med.* **53**: 43-54.

9. Bertsch, T., Triebel, J., Bollheimer, C., Christ, M., Sieber, C., Fassbender, K., Heppner, H. J. 2015. C-reactive protein and the acute phase reaction in geriatric patients. *Z. Gerontol. Geriatr.* **48**: 595-600.
10. Black, S., Kushner, I., Samols, D. 2004. C-reactive Protein. *J. Biol. Chem.* **279** : 48487-48490.
11. Borges, A. S., Divers, T. J., Stokol, T. and Mohammed, O. H. 2007. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 489–494.
12. Burvenich, C., Bannerman, D. D., Lippolis, J. D., Peelman, L., Nonnecke, B. J., Kehrl, M. E. Jr. and Paape, M. J. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.* **90 Suppl 1**: E39-54.
13. Cassat, J. E., Skaar, E. P. 2013. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*. **13**: 509-519.
14. Cénac, A., Simonoff, M. and Djibo, A. 1996. Nutritional status and plasma trace elements in peripartum cardiomyopathy. A comparative study in Niger. *J. Cardiovasc. Risk* **3**: 483–487.
15. Cherayil, B. J. 2011. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol. Res.* **50**: 1-9.

16. Cherayil, B. J., Ellenbogen, S. and Shanmugam, N. N. 2011. Iron and intestinal immunity. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**:523-528.
17. Chiba, M. 1994. Bioinorganic chemistry: a science in the spotlight—interface of chemistry, biology, agriculture and medicine. *Int. J. PIXE.* **4**: 201–216.
18. Constante, M., Jiang, W., Wang, D., Raymond, V. A., Bilodeau, M. and Santos, M. M. 2006. Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291**: G229–G237.
19. Daher, R., Karim, Z. 2017. Iron metabolism: State of the art. *Transfus. Clin. Biol.* **24**: 115-119.
20. Dosogne, H., Meyer, E., Sturk, A., van Loon, J., Massart-Leën, A. M., Burvenich, C. 2002. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine Escherichia coli mastitis. *Inflamm. Res.* **51**: 201-205.
21. Dunn, C. 1994. Acute coliform mastitis in a dairy cow. *Can. Vet. J.* **35**: 301-302.
22. Eberhart, R. J. 1984. Coliform mastitis. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* **6**: 287-300.
23. Eckersall, P. D. and Bell, R. 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* **185**: 23–27.
24. Eisa, M. H., Shen, H., Jin, W., Alaamer, A. S., Al-Rajhi, M. A. and Idriss, H. 2016. PIXE study on the effects of parathyroid hormone on elemental content in rat bones. *Phys. Med.* **32**: 1615–1620.



25. Erskine, R. J., Tyler, J. W., Riddell, M. G. Jr., Wilson, R. C. 1991. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **198**: 980-984.
26. Erskine, R. J. and Bartlett, P. C. 1993. Serum concentrations of copper, iron, and zinc during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J. Dairy. Sci.* **76**:408-413.
27. Erskine, R. J., Bartlett, P. C., VanLente, J. L., Phipps, C. R. 2002. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **85**: 2571-2575.
28. Etzel, K. R., Swerdel, M. R., Swerdel, J. N. and Cousins, R. J. 1982. Endotoxin-induced changes in copper and zinc metabolism in the Syrian hamster. *J. Nutre.* **112**: 2363-2373.
29. Fukuda, H., Ebara, M., Okabe, S., Yoshikawa, M., Sugiura, N., Saisho, H., Kondo, F. and Yukawa, M. 2004. Metal contents of liver parenchyma after percutaneous ethanol injection or radiofrequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma before and after trientine hydrochloride therapy. *J. Lab. Clin. Med.* **143**: 333–339.
30. Ganz, T. and Nemeth, E. 2016. Iron Balance and the Role of Hepcidin in Chronic Kidney Disease. *Semin. Nephrol.* **36**: 87-93.
31. Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W. L., Taylor, K. M., Sohail, M., Krausz, T., Pepys, M. B. 1999. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J. Exp. Med.* **1190**: 1733-1740.
32. Hagiwara, K., Yamanaka, H., Hisaeda, K., Taharaguchi, S., Kirisawa, R. and Iwai, H. 2001.

- Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet. Res. Commun.* **25**: 99-108.
33. Hatano, R., Ebara, M., Fukuda, H., Yoshikawa, M., Sugiura, N., Kondo, F., Yukawa, M. and Saisho, H. 2000. Accumulation of copper in the liver and hepatic injury in chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**: 786–791.
34. Hirayama, T. and Nagasawa, H. 2017. Chemical tools for detecting Fe ions. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **60**: 39-48.
35. Hisaeda, K., Arima, H., Sonobe, T., Nasu, M., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Takahashi, T., Kikuchi, N., Nagahata, H. 2011. Changes in acute-phase proteins and cytokines in serum and milk whey from dairy cows with naturally occurring peracute mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* and the relationship to clinical outcome. *J. Vet. Med. Sci.* **73**: 1399-404.
36. Hiss, S., Mielenz, M., Bruckmaier, R. M. and Sauerwein, H. 2004. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *J. Dairy Sci.* **87**: 3778-3784.
37. Hogan, J. and Larry Smith, K. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* **34**: 507-519.
38. Idoate, I., Vander Ley, B., Schultz, L. and Heller, M. 2015. Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **163**: 221–226.

39. Ilbäck, N. G., Benyamin, G., Lindh, U., Fohlman, J., Friman, G. 2003. Trace element changes in the pancreas during viral infection in mice. *Pancreas*. **26**: 190-196.
40. Jacobsen, S., Jensen, J. C., Frei, S., Jensen, A. L. and Thoenner, M. B. 2005. Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Vet. J.* **37**: 552-556.
41. Jacobsen, S., Nielsen, J. V., Kjølgaard-Hansen, M., Toelboell, T., Fjeldborg, J., Halling-Thomsen, M., Martinussen, T. and Thoenner, M. B. 2009. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Vet. Surg.* **38**: 762–769.
42. Jones, G. M., Pearson, R. E., Clabaugh, G. A. and Heald, C. W. 1984. Relationships between somatic cell counts and milk production. *J. Dairy Sci.* **67**: 1823-1831.
43. Jones, M. L., Allison, R. W. 2007. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **23**: 377-402.
44. Kandasamy, S., Green, B. B., Benjamin, A. L. and Kerr, D. E. 2011. Between-cow variation in dermal fibroblast response to lipopolysaccharide reflected in resolution of inflammation during *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* **94**: 5963-5975.
45. Kerro Dego, O., Oliver, S. P. and Almeida, R. A. 2012. Host-pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **155**: 291-297.

46. Krause, A., Neitz, S., Mägert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K. 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS. Lett.* **480**: 147-150.
47. Kriek, N. P., Sly, M. R., du Bruyn, D. B., de Klerk, W. A., Renan, M. J., Van Schalkwyk, D. J. and Van Rensburg, S. J. 1982. Dietary wheaten bran in baboons: long-term effect on the morphology of the digestive tract and aorta, and on tissue mineral concentrations. *Br. J. Exp. Pathol.* **63**: 254–268.
48. Lohuis, J. A., Verheijden, J. H., Burvenich, C., van Miert, A. S. 1988. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 2. Metabolic aspects. *Vet. Q.* **10**: 117-125.
49. Lohuis, J.A. 1990. Some aspects of treatment of coliform mastitis. *Cornell Vet.* **80**: 223-227.
50. Lohuis, J. A., Schukken, Y. H., Verheijden, J. H., Brand, A. Van Miert, A. S. 1990. Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. *J. Dairy Sci.* **73**: 333-341.
51. Lohuis, J. A., Schukken, Y. H., Henricks, P. A., Heyneman, R., Burvenich, C., Verheijden, J. H., Van Miert, A. S., Brand, A. 1990. Preinfection functions of blood polymorphonuclear leukocytes and the outcome of experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J. Dairy. Sci.* **73**: 342-350.
52. Mavangira, V., Mangual, M. J., Gandy, J. C. and Sordillo, L. M. 2016. 15-F2t-Isoprostane Concentrations and Oxidant Status in Lactating Dairy Cattle with Acute Coliform Mastitis.

- J. Vet. Intern. Med.* **30**: 339-347.
53. Murata, H., Shimada, N. and Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168: 28–40.
54. Nagasawa, Y., Kiku, Y., Sugawara, K., Yabusaki, T., Oono, K., Fujii, K., Suzuki, T., Maehana, K. and Hayashi, T. 2019. The bacterial load in milk is associated with clinical severity in cases of bovine coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* **81**:107-112.
55. Nakas, C. T., Dalrymple-Alford, J. C., Anderson, T. J. and Alonzo, T. A. 2013. Generalization of Youden index for multipleclass classification problems applied to the assessment of externally validated cognition in Parkinson disease screening. *Stat. Med.* **32**: 995-1003.
56. National Research Council. 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. pp. 1–70. National Academy Press, Washington, D.C.
57. Neumann, S. 2003. Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats. *Comp. Clin. Path.* **12**: 90-94.
58. Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A. and Ganz, T. 2003. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* **101**:2461–2463.
59. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K. and Ganz, T. 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* **113**:1271–1276.

60. Ong, S. T., Ho, J. Z., Ho, B. and Ding, J. L. 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* **211**: 295-314.
61. Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **276**: 7806-7810.
62. Pepys, M. B., Hirschfield, G. M. 2003. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* **111**: 1805-1812.
63. Peretz, A., Nève, J., Jeghers, O. and Pelen, F. 1993. Zinc distribution in blood components, inflammatory status, and clinical indexes of disease activity during zinc supplementation in inflammatory rheumatic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 690–694.
64. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loréal, O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* **276**: 7811-7819.
65. Podder, M. P., Rogers, L., Daley, P. K., Keefe, G. P., Whitney, H. G., Tahlan, K. 2014. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *PLoS. One.* **9**: e106518.
66. Przybylowski, P., Malyszko, J. S., Macdougall, I. C. and Malyszko, J. 2013. Iron metabolism, hepcidin, and anemia in orthotopic heart transplantation recipients treated with mammalian target of rapamycin. *Transplant. Proc.* **45**: 387–390.
67. Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* **34**: 565–578.

68. Sakaguchi, S. and Furusawa, S. 2006. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**: 167–177.
69. Sakemi, Y., Tamura, Y. and Hagiwara, K. 2011. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J. Dairy Res.* **78**: 118-121.
70. Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* **34**: 475-491.
71. Sera, K., Futatsugawa, S., Matsuda, K. and Miura, Y. 1996. Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples. *Int. J. PIXE* **6**: 467–481.
72. Sera, K., Futatsugawa, S. and Matsuda, K. 1999. Quantitative analysis of untreated bio-samples. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* **B 150**: 226–233.
73. Shimamori, T., Noda, J., Tsukano, K., Sera, K., Yokota, H., Koiwa, M., Suzuki, T. and Suzuki K. 2017. Particle-Induced X-ray Emission Analysis of Zierum Trace and Major Elements in Cattle with Acute Coliform Mastitis. *Jpn. J. Vet. Res.* **65**:29-37.
74. Shimamori, T., Tsukano, K., Sera, K., Noda, J., Suzuki, K. 2019. Sequential changes in serum zinc concentrations in calves with experimentally induced endotoxin shock measured by the particle-induced X-ray emission method. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 165-168.
75. Sordillo, L. M. and Streicher, K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **7**: 135-146.

76. Sun, D., Li, C., Gu, C., Chen, J., Qu, Y., Wang, X., Gao, J., Wei, S., Wang, J., Wu, R. and Guo, D. 2015. Analysis of Mineral Elements, Metabolism, and Inflammation Indexes in the Plasma of Dairy Cows Suffering from Different Degrees of Lameness. *Biol. Trace Elem. Res.* **168**: 372-379.
77. Suojala, L., Orro, T., Järvinen, H., Saatsi, J. and Pyörälä, S. 2008. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet. Scand.* **50**: 18.
78. Suriyasathaporn, W., Schukken, Y. H., Nielen, M., Brand, A. 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J. Dairy Sci.* **83**: 1248-1255.
79. Suzuki, K., Yamaya, Y., Kanzawa, N., Chiba, M., Sera, K. and Asano, R. 2008. Trace and Major elements Status in bronchoalveolar Lavage Fluid in dogs with or without Bronchopneumonia. *Biol. Trace Elem. Res.* **124**: 92-96.
80. Suzuki, K., Higuchi, H., Iwano, H., Lakritz, J., Sera, K., Koiwa, M., Taguchi, K. 2012. Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of Mycoplasma bronchopneumonia in calves. *Biol. Trace Elem. Res.* **145**: 166-171.
81. Suzuki, K., Noda, J., Yanagisawa, M., Kawazu, I., Sera, K., Fukui, D., Asakawa, M., Yokota, H. 2012. Particle-induced X-ray emission analysis of elements in plasma from wild and captive sea turtles (*Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas*, and *Caretta caretta*) in Okinawa, Japan. *Biol. Trace Elem. Res.* **148**: 302–308.



82. Suzuki, K., Noda, J., Yanagisawa, M., Kawazu, I., Sera, K., Fukui, D., Asakawa, M., Yokota, H. 2012. Relationships between carapace sizes and plasma major and trace element status in captive hawksbill sea turtles (*Eretmochelys imbricata*). *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1677–1680.
83. Tsukano, K., Shimamori, T., Fukuda, T., Nishi, Y., Otsuka, M., Kitade, Y., Suzuki, K. 2019. Serum iron concentration as a marker of inflammation in young cows that underwent dehorning operation. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 626-628.
84. Ullah, Z., Ullah, M. I., Hussain, S., Kaul, H., Lone, K. P. 2017. Determination of Serum Trace Elements (Zn, Cu, and Fe) in Pakistani Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biol Trace Elem Res.* **175**: 10-16.
85. Vandeputte-Van Messom, G., Burvenich, C., Roets, E., Massart-Leën, A. M., Heyneman, R., Kremer, W. D. and Brand, A. 1993. Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Res.* **60**: 19-29.
86. Vels, L., Røntved, C. M., Bjerring, M. and Ingvarlsen, K. L. 2009. Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* **92**: 922–934.
87. Ward, C. G., Bullen, J. J. and Rogers, H. J. 1996. Iron and infection: new developments and their implications. *J. Trauma* **41**: 356-364.

88. Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., McSweeney, K. D., Dinsmore, R. P., Goodell, G. and Callan, R. J. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **219**: 976-981.
89. Yin, C., Liu, W., Liu, Z., Huang, Y., Ci, L., Zhao, R., Yang, X. 2017. Identification of potential serum biomarkers in pigs at early stage after Lipopolysaccharide injection. *Res. Vet. Sci.* **111**: 140-146.
90. Zhang, A. S. 2010. Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Adv. Nutr.* **1**: 38-45.
91. Zhang, W., Zhang, R., Wang, T., Jiang, H., Guo, M., Zhou, E., Sun, Y., Yang, Z., Xu, S., Cao, Y. and Zhang, N. 2014. Selenium inhibits LPS-induced pro-inflammatory gene expression by modulating MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in mouse mammary epithelial cells in primary culture. *Inflammation* **37**: 478-485.
92. Ziv, G. 1992. Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **8**: 1-15.

## 略 語 一 覧

ACM	:	Acute Coliform Mastitis
Al	:	アルミニウム
APP	:	Acute Phase Protein
As	:	ヒ素
AUC	:	Receiver Operating Characteristic 曲線下面積
Br	:	臭素
Ca	:	カルシウム
Cd	:	カドミウム
Cl	:	クロール
Co	:	コバルト
Cr	:	クロム
CRP	:	C reactive Protein
Cu	:	銅
CV	:	Coefficient of Variation
Fe	:	鉄
Ga	:	ガリウム
GAPDH	:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Hp	:	Haptoglobin
ICP	:	Inductive-Coupled Plasma
ICP-MS	:	Inductive-Coupled Plasma Mass Spectrometers
IL	:	Interleukin
IMI	:	Intra-Mammary Inflammation
K	:	カリウム
LAL-KTA	:	Limulus Amebocyte Lysate-Kinetic Turbidimetric
LPS	:	Lipopolysaccharide
Mg	:	マグネシウム
Mn	:	マンガン
Mo	:	モリブデン
Na	:	ナトリウム

NAA	:	Neutron Activation Analysis
Nb	:	ニオブ
Ni	:	ニッケル
Nitroso-PSAP	:	2-nitroso-5-(N-propyl-N-sulphopropylamino)phenol
Pb	:	鉛
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PIXE	:	Particle Induced X-ray Emission
Rb	:	ルビジウム
ROC	:	Receiver Operating Characteristic
S	:	硫黄
SAA	:	Serum Amyloid A
SCC	:	体細胞数
SD	:	標準偏差
Se	:	セレン
Si	:	ケイ素
Sr	:	ストロンチウム
Ti	:	チタン
TNF- $\alpha$	:	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
V	:	バナジウム
Y	:	イットリウム
Zn	:	亜鉛
Zr	:	ジルコニウム

## 成績の公表

本主論文の成績は下記の通り誌上公表した。

### 第 1 章第 1 節および第 3 章第 1 節

Serum iron concentration as a marker of inflammation in young cows that underwent dehorning operation.

Tsukano, K., Shimamori, T., Fukuda, T., Nishi, Y., Otsuka, M., Kitade, Y. and Suzuki, K.  
*J. Vet. Med. Sci.* 2019 Apr 27;81(4):626-628.

### 第 1 章第 2 節

Particle-Induced X-ray Emission Analysis of Zierum Trace and Major Elements in Cattle with Acute Coliform Mastitis.

Shimamori, T., Noda, J., Tsukano, K., Sera, K., Yokota, H., Koiwa, M., Suzuki, T. and Suzuki K.  
*Jpn. J. Vet. Res.* 2017 Feb;65(1):29-37.

### 第 2 章第 1 節

Sequential changes in serum zinc concentrations in calves with experimentally induced endotoxin shock measured by the particle-induced X-ray emission method.

Shimamori, T., Tsukano, K., Sera, K., Noda, J. and Suzuki, K.  
*J. Vet. Med. Sci.* 2019 Feb 9;81(2):165-168.

### 第 2 章第 2 節および第 3 章第 2 節

現在 *Acta Veterinaria Hungarica* に投稿中

## ***Study on inflammation evaluation of cattle using serum Fe concentration as an alternative to inflammation markers***

Rakuno Gakuen University Graduate School

Veterinary Medicine、 Large Animal Surgery

Shimamori Toshio

The objective of this study was to evaluate whether serum trace elements associated with inflammation, particularly serum iron (Fe) concentration, can be clinically apply as a marker in inflammatory diseases of cattle and to clarify some of the mechanisms which serum Fe concentration decreases due to bovine inflammation. In addition, present study examined whether it is possible to assess the bovine inflammatory status by serum Fe concentration simply, inexpensively and correctly in the clinical cases.

In chapter 1 sections 1, we examined the accuracy and precision of the particle-induced X-ray emission (PIXE) method in trace and major concentrations in bovine serum. The PIXE method used in the present study is a fast and reliable multi-element qualitative and quantitative analytical tool that is easy to use. As a result, 14 elements (Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Mn, Ni, Pb, Se, Sr and Zn) except Mg that were confirmed to be sufficiently accurate and precise were targeted. The aim of chapter 1 sections 2 was to measure changes in the serum concentrations of some elements in cows with acute coliform mastitis (ACM) using a PIXE analysis and to screen for useful elements as diagnostic markers. As a result, the serum concentrations of Fe and Zn in cows with ACM were significantly lower than those of in control. In addition, the serum Fe concentration was significantly lower in cows with a poor prognosis than in those with a good prognosis or controls. The proposed diagnostic cut-off for the serum Fe concentration for a poor ACM prognosis based on the receiver operating characteristic (ROC) curves was  $< 0.82 \mu\text{g/ml}$ . The area under the curve (AUC) for the serum Fe concentration was 0.713. These results indicated that assessing the elemental composition of serum, particularly Fe, is a promising prognostic tool for determining the outcomes of cows with severe acute coliform mastitis.

If the blood-milk barrier is destroyed after intramammary infection, ACM can result in endotoxemia. However, few reports have investigated the variation of serum trace and major concentrations in cattle with endotoxemia. In chapter 2 sections 1, we measured changes in the serum concentrations of some elements in endotoxin-challenged calves using a PIXE analysis and to screen for elements useful as diagnostic markers of endotoxemia. As a result, there were significant changes during the observation period in serum Fe and Zn concentrations in endotoxin-challenged calves. Serum Zn concentrations were  $0.88 \pm 0.37$   $\mu\text{g/ml}$  before the endotoxin challenge and then significantly decreased, reaching  $0.18 \pm 0.07$   $\mu\text{g/ml}$  8 hr after the endotoxin challenge ( $p < 0.01$ ). Serum Fe levels in endotoxin-challenged calves were significantly lower from 24 to 48 hr after the endotoxin challenge than the prechallenge values. Therefore, our result indicated that serum Fe concentration can be useful diagnostic markers for calves with endotoxemia. It is well known that hepcidin is essential for systemic Fe homeostasis. Hepcidin is predominantly secreted by hepatocytes in response to inflammation, and its major function is to sequester Fe. However, it is unclear whether hepcidin is involved in the reduction of Fe concentration due to inflammation in calves, as in human. In chapter 2 sections 2, we observed the sequential changes in the expression of Interleukin (IL)-6 and hepcidin mRNA in the cattle that received endotoxin. As a result, in hepatic tissues, significantly high expression of IL-6 and hepcidin mRNA in cattle were maintained from 2 to 8 hrs after endotoxin challenge as compared with the pre-values. Then, the significantly low serum Fe level in the cattle was observed from 24 to 48 hrs after endotoxin administration as compared with the pre-value. We found that inflammation due to endotoxin induced hepcidin expression and reduced the serum Fe concentration in cattle, as in human.

While serum Fe concentration has been shown to be useful as a marker of bovine inflammation, it is important how to apply in clinical. Namely, measurement of Fe concentration needs to be simple, cheap and accurate for veterinary practitioner. The 2-nitroso-5-(N-propyl-N-sulphopropylamino)phenol (Nitroso-PSAP) method used in this study is well established and accurate methods for quantification of Fe in aqueous samples without the need of expensive instruments such as atomic absorption and inductive-coupled plasma mass spectrometers. The aim of the chapter 3 sections 1 was to measure changes in the serum Fe concentration using nitroso-PSAP in cattle that underwent the dehorning operation, and assess



the usefulness of serum Fe concentration as a marker of inflammation. The Fe concentration in serum significantly decreased, and reached  $90.0 \pm 36.4 \mu\text{g/dl}$  at 24 hr. Significantly low levels of serum Fe concentration in cows that underwent the dehorning operation was maintained at 12, 24, and 48 hr, when compared to the initial value. In addition, serum Fe concentration was significantly and negatively correlated with serum amyloid A concentration. Therefore, it has been suggested that serum Fe concentration by the Nitoroso-PSAP method may be applied as a simple and inexpensive marker for inflammation in cattle with non-bacterial inflammation. In chapter 3 sections 2, we evaluated whether the serum Fe concentration by Nitoroso-PSAP method is useful as a prognostic biomarker for cows with ACM, same as PIXE method in chapter 1. As a result, the serum concentration of Fe in cows with ACM was significantly lower than those of in control. In addition, the serum Fe concentration was significantly lower in cows with a poor prognosis than in those with a good prognosis or controls. The proposed diagnostic cut-off for the serum Fe concentration for a poor ACM prognosis based on the ROC curves was  $< 31.5 \mu\text{g/dl}$ . The AUC for the serum Fe concentration was 0.781. These results indicated that assessing the serum Fe concentration by Nitoroso-PSAP method is a promising prognostic tool for determining the outcomes of cows with severe acute coliform mastitis, as in PIXE method.

In this study, we have verified based on scientific evidence that the serum Fe concentration is a sensitive biomarker that reflects the severity of inflammation, making it a useful marker in clinical cases.